



(21) 申請案號：108100760

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 01 月 08 日

(51) Int. Cl. : *A61K35/17 (2015.01)*
*C12N5/0783 (2010.01)**A61K39/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2018/01/08	美國	62/614,887
2018/04/27	美國	62/664,034
2018/05/09	美國	62/669,319
2018/07/13	美國	62/697,921
2018/09/21	美國	62/734,868
2018/11/30	美國	62/773,715

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

(72) 發明人：夏提爾科陶德 賽西爾 CHARTIER-COURTAUD, CECILE (US)；理堤皮海 克里 RITTHIPICHAJ, KRIT (TH)

(74) 代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：70 項 圖式數：54 共 661 頁

(54) 名稱

產生富含腫瘤抗原特異性 T 細胞的腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 產物之方法

(57) 摘要

本發明提供用於重新編程 TIL 以製備具有增加的治療療效之 TIL 治療性族群之經改良及/或經縮短的過程及方法。該等經重新編程的 TIL 用於治療性治療方案(regimen)。

The present invention provides improved and/or shortened processes and methods for reprogramming TILs in order to prepare therapeutic populations of TILs with increased therapeutic efficacy. Such reprogrammed TILs find use in therapeutic treatment regimens.

【發明說明書】

【中文發明名稱】

產生富含腫瘤抗原特異性 T 細胞的腫瘤浸潤淋巴球
(T I L) 產物之方法

【英文發明名稱】

PROCESSES FOR GENERATING TIL PRODUCTS ENRICHED
FORTUMOR ANTIGEN-SPECIFIC T-CELLS

相關申請案的交互參照

本申請案主張美國臨時專利申請案 62/614,887 (2018年1月8日提出)、美國臨時專利申請案 62/664,034 (2018年4月27日提出)、美國臨時專利申請案 62/669,319 (2018年5月9日提出)、美國臨時專利申請案 62/697,921 (2018年7月13日提出)、美國臨時專利申請案 62/734,868 (2018年9月21日提出)及美國臨時專利申請案 62/773,715 (2018年11月30日提出)之優先權，彼等全文以引用方式併入本文中。

【技術領域】

【0001】本發明係關於產生富含腫瘤抗原特異性 T 細胞的腫瘤浸潤淋巴球(TIL)產物之方法。

【先前技術】

【0002】使用過繼性轉移腫瘤浸潤淋巴球(TIL)治療

大體積、難治性癌症對於預後不良患者代表一種強大的治療方案。Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393。成功免疫療法需要大量的TIL，而商業化需要強健且可靠的製程。由於細胞擴增的技術、後勤及法規問題，要達成此是一項挑戰。基於IL-2的TIL擴增然後「快速擴增過程」(REP)已因其速度及效率而成為TIL擴增的較佳方法。Dudley, et al., Science 2002, 298, 850-54; Dudley, et al., J. Clin.Oncol.2005, 23, 2346-57; Dudley, et al., J. Clin.Oncol.2008, 26, 5233-39; Riddell, et al., Science 1992, 257, 238-41; Dudley, et al., J. Immunother.2003, 26, 332-42。REP可在14天期間導致1,000倍的TIL擴增，儘管其需要大量過量(例如，200倍)的經照射(irradiated)的通常來自多個供體之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC，亦稱為單核細胞(MNC))作為餵養細胞，還需要抗CD3抗體(OKT3)及高劑量的IL-2。Dudley, et al., J. Immunother.2003, 26, 332-42。經歷REP程序的TIL已在宿主免疫抑制後的黑色素瘤患者中產生成功的過繼性細胞療法。

【0003】有提供更強效或更有效的TIL製造過程及基於該等過程之療法的迫切需求，該等過程適用於商業規模製造且經法規核准用於多個臨床中心的人患者。本發明藉由提供用於重新編程TIL以製備具有增加的治療療效之TIL治療性族群之暫時性基因改變過程來符合此需求。

【發明內容】

【0004】本發明提供用於擴增 TIL 及產生治療性 TIL 族群的經改良及/或經縮短的方法。

【0005】本發明提供一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法，其包含：(i) 自患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；(ii) 藉由在包含 IL-2 及視需要 OKT-3 之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群來執行第一擴增以產生第二 TIL 族群；(iii) 藉由用額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 補充該第二 TIL 族群之細胞培養基來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群於數量上高於該第二 TIL 族群至少 100 倍，且其中該第二擴增執行至少 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群；及 (iv) 使該第二及/或第三 TIL 族群暴露至轉錄因子 (TF) 及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該 TF 及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性 TIL 族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性 T 細胞的數量。

【0006】在一些實施態樣中，方法進一步包含使第二及/或第三 TIL 族群暴露至轉錄因子 (TF) 及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中 TF 及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供治療性 TIL 族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性 T 細胞的數量。

【0007】本發明亦提供一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法，其包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段

而自該患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

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

(d) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二及/或第三 TIL 族群暴露至轉錄因子 (TF) 及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該 TF 及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性 TIL 族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性 T 細胞的數量；

(f) 收集獲自步驟 (d) 之該治療性 TIL 族群，其中自步驟 (d) 轉變至步驟 (e) 無需打開該系統而發生；及

(g) 將得自步驟 (e) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (e) 轉移至步驟 (f) 無需打開該系統而發

生。

【0008】在一些實施態樣中，方法進一步包含藉由用額外的IL-2、額外的OKT-3及額外的APC補充第三TIL族群之細胞培養基來在步驟(iv)之前或之後執行額外第二擴增，其中額外第二擴增執行至少14天以獲得比起步驟(iii)所獲得者較大的治療性TIL族群，其中較大的治療性TIL族群展現腫瘤抗原特異性T細胞數量的改變。

【0009】在一些實施態樣中，方法進一步包含使用冷凍保存過程將包含步驟(f)之經收集的TIL族群之輸注袋冷凍保存的步驟。

【0010】在一些實施態樣中，冷凍保存過程使用1:1比例的經收集的TIL族群對冷凍保存介質執行。

【0011】在一些實施態樣中，抗原呈現細胞係周邊血液單核細胞(PBMC)。在一些實施態樣中，PBMC經照射且為同種異體。在一些實施態樣中，PBMC係於步驟(d)之第9至14天中任一天添加至細胞培養。在一些實施態樣中，抗原呈現細胞係人工抗原呈現細胞。

【0012】在一些實施態樣中，步驟(e)之收集係使用基於膜之細胞處理系統執行。

【0013】在一些實施態樣中，步驟(e)之收集係使用LOVO細胞處理系統執行。

【0014】在一些實施態樣中，多個片段包含約4至約50個片段，其中各片段具有約27 mm³的體積。

【0015】在一些實施態樣中，多個片段包含約30至約

60個片段，其總體積為約1300 mm³至約1500 mm³。

【0016】在一些實施態樣中，多個片段包含約50個片段，其總體積為約1350 mm³。

【0017】在一些實施態樣中，多個片段包含約50個片段，其總質量為約1克至約1.5克。

【0018】在一些實施態樣中，細胞培養基提供於選自由G容器及Xuri細胞袋所組成之群組之容器中。

【0019】在一些實施態樣中，步驟(d)之細胞培養基進一步包含IL-15及/或IL-21。

【0020】在一些實施態樣中，IL-2濃度係約10,000 IU/mL至約5,000 IU/mL。

【0021】在一些實施態樣中，IL-15濃度係約500 IU/mL至約100 IU/mL。

【0022】在一些實施態樣中，IL-21濃度係約20 IU/mL至約0.5 IU/mL。

【0023】在一些實施態樣中，步驟(f)之輸注袋係含HypoThermosol之輸注袋。

【0024】在一些實施態樣中，冷凍保存介質包含二甲亞砜(DMSO)。在一些實施態樣中，冷凍保存介質包含7%至10%二甲亞砜(DMSO)。

【0025】在一些實施態樣中，步驟(c)之第一期間及步驟(e)之第二期間各自個別地於一段10天、11天或12天的期間內執行。

【0026】在一些實施態樣中，步驟(c)之第一期間及步

驟(e)之第二期間各自個別地於一段11天的期間內執行。

【0027】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(f)在一段約10天至約22天的期間之內執行。

【0028】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(f)在一段約20天至約22天的期間之內執行。

【0029】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(f)在一段約15天至約20天的期間之內執行。

【0030】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(f)在一段約10天至約20天的期間之內執行。

【0031】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(f)在一段約10天至約15天的期間之內執行。

【0032】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(f)在22天或更少天內執行。

【0033】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(f)在20天或更少天內執行。

【0034】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(f)在15天或更少天內執行。

【0035】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(f)在10天或更少天內執行。

【0036】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(f)及冷凍保存在22天或更少天內執行。

【0037】 在一些實施態樣中，步驟(e)所收集之治療性TIL族群包含對治療有效劑量的TIL而言足夠的TIL。

【0038】 在一些實施態樣中，對治療有效劑量而言足

夠的 TIL 數量係約 2.3×10^{10} 至約 13.7×10^{10} 個。

【0039】 在一些實施態樣中，步驟 (b) 至 (e) 在單一容器中執行，其中在單一容器中執行步驟 (b) 至 (e) 相較於在超過一個容器中執行步驟 (b) 至 (e) 導致每個經切除之腫瘤 (resected tumor) 的 TIL 產率增加。

【0040】 在一些實施態樣中，抗原呈現細胞係於步驟 (d) 之第二期間添加至 TIL 而無需打開系統。

【0041】 在一些實施態樣中，當投予至個體時，步驟 (d) 之第三 TIL 族群提供至少五倍或更多倍的干擾素- γ 產生。

【0042】 在一些實施態樣中，微生物污染之風險相較於開放系統減少。

【0043】 在一些實施態樣中，來自步驟 (f) 或 (g) 之 TIL 係輸注至患者。

【0044】 在一些實施態樣中，多個片段包含約 4 個片段。

【0045】 本發明亦提供一種用於治療癌症個體之方法，方法包含投予經擴增的腫瘤浸潤淋巴球 (TIL)，其包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自個體所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含 IL-2 之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群來執行第一擴增以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增

是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(b)轉變至步驟(c)無需打開該系統而發生；

(d) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二及/或第三TIL族群暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性TIL族群中增加的腫瘤抗原表現及/或增加腫瘤抗原特異性T細胞的數量；

(f) 收集獲自步驟(d)之該治療性TIL族群，其中自步驟(d)轉變至步驟(e)無需打開該系統而發生；及

(g) 將得自步驟(e)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(e)轉移至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(h) 使用冷凍保存過程將包含步驟(f)之該經收集的TIL族群之該輸注袋視需要冷凍保存；及

(i) 投予治療有效劑量的來自步驟(g)之該輸注袋的該

第三 TIL 族群至該患者。

【0046】 在一些實施態樣中，步驟(f)所收集之治療性 TIL 族群包含對步驟(h)之投予治療有效劑量的 TIL 而言足夠的 TIL。

【0047】 在一些實施態樣中，對步驟(h)之投予治療有效劑量而言足夠的 TIL 數量係約 2.3×10^{10} 至約 13.7×10^{10} 個。

【0048】 在一些實施態樣中，抗原呈現細胞(APC)係 PBMC。

【0049】 在一些實施態樣中，PBMC 係於步驟(d)之第 9 至 14 天中任一天添加至細胞培養。

【0050】 在一些實施態樣中，在步驟(h)之投予治療有效劑量的 TIL 細胞之前，已向患者投予非骨髓清除式淋巴球耗盡方案(non-myeloablative lymphodepletion regimen)。

【0051】 在一些實施態樣中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含投予劑量為 60 mg/m²/天之環磷醯胺計二天且隨後投予劑量為 25 mg/m²/天之氟達拉濱(fludarabine)計五天的步驟。

【0052】 在一些實施態樣中，方法進一步包含始於步驟(h)之向患者投予 TIL 細胞之後當天使用高劑量 IL-2 方案(regimen)治療患者的步驟。

【0053】 在一些實施態樣中，高劑量 IL-2 方案包含每八小時以 15 分鐘推注靜脈內輸液(bolus intravenous infusion)投予 600,000 或 720,000 IU/kg 直到耐受為止。

【0054】在一些實施態樣中，癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人乳突瘤病毒所造成的癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌及腎細胞癌。

【0055】在一些實施態樣中，癌症係選自由黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌及NSCLC所組成之群組。

【0056】在一些實施態樣中，癌症係黑色素瘤。

【0057】在一些實施態樣中，癌症係HNSCC。

【0058】在一些實施態樣中，癌症係子宮頸癌。

【0059】在一些實施態樣中，癌症係NSCLC。

【0060】本發明亦提供用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(a) 將自患者所切除的腫瘤之經處理的腫瘤片段添加至密閉系統以獲得第一TIL族群；

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

(c) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得

該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (b) 轉變至步驟 (c) 無需打開該系統而發生；

(d) 收集獲自步驟 (c) 之該治療性 TIL 族群，其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；及

(e) 將得自步驟 (d) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (d) 轉移至步驟 (e) 無需打開該系統而發生。

【0061】在一些實施態樣中，步驟 (d) 所收集之治療性 TIL 族群包含對治療有效劑量的 TIL 而言足夠的 TIL。

【0062】在一些實施態樣中，對治療有效劑量而言足夠的 TIL 數量係約 2.3×10^{10} 至約 13.7×10^{10} 個。

【0063】在一些實施態樣中，方法進一步包含使用冷凍保存過程將包含經收集的 TIL 族群之輸注袋冷凍保存的步驟。

【0064】在一些實施態樣中，冷凍保存過程使用 1:1 比例的經收集的 TIL 族群對冷凍保存介質執行。

【0065】在一些實施態樣中，抗原呈現細胞係周邊血液單核細胞 (PBMC)。

【0066】在一些實施態樣中，PBMC 經照射且為同種異體。

【0067】如請求項 68 之方法，其中該 PBMC 係於步驟 (e) 之第 9 至 14 天中任一天添加至該細胞培養。

【0068】 在一些實施態樣中，抗原呈現細胞係人工抗原呈現細胞。

【0069】 在一些實施態樣中，步驟(d)之收集係使用 LOVO細胞處理系統執行。

【0070】 在一些實施態樣中，多個片段包含約4至約50個片段，其中各片段具有約 27 mm^3 的體積。

【0071】 在一些實施態樣中，多個片段包含約30至約60個片段，其總體積為約 1300 mm^3 至約 1500 mm^3 。

【0072】 在一些實施態樣中，多個片段包含約50個片段，其總體積為約 1350 mm^3 。

【0073】 在一些實施態樣中，多個片段包含約50個片段，其總質量為約1克至約1.5克。

【0074】 在一些實施態樣中，多個片段包含約4個片段。

【0075】 在一些實施態樣中，第二細胞培養基提供於選自由G容器及Xuri細胞袋所組成之群組之容器中。

【0076】 在一些實施態樣中，步驟(e)之輸注袋係含 HypoThermosol之輸注袋。

【0077】 在一些實施態樣中，步驟(b)之第一期間及步驟(c)之第二期間各自個別地於一段10天、11天或12天的期間內執行。

【0078】 在一些實施態樣中，步驟(b)之第一期間及步驟(c)之第二期間各自個別地於一段11天的期間內執行。

【0079】 在一些實施態樣中，步驟(a)至(e)在一段約

10天至約22天的期間之內執行。

【0080】在一些實施態樣中，步驟(a)至(e)在一段約10天至約20天的期間之內執行。

【0081】在一些實施態樣中，步驟(a)至(e)在一段約10天至約15天的期間之內執行。

【0082】在一些實施態樣中，步驟(a)至(e)在22天或更少天內執行。

【0083】在一些實施態樣中，步驟(a)至(e)及冷凍保存在22天或更少天內執行。

【0084】在一些實施態樣中，步驟(b)至(e)在單一容器中執行，其中在單一容器中執行步驟(b)至(e)相較於在超過一個容器中執行步驟(b)至(e)導致每個經切除之腫瘤(resected tumor)的TIL產率增加。

【0085】在一些實施態樣中，抗原呈現細胞係於步驟(c)之第二期間添加至TIL而無需打開系統。

【0086】在一些實施態樣中，微生物污染之風險相較於開放系統減少。

【0087】在一些實施態樣中，來自步驟(e)之TIL係輸注至患者。

【0088】在一些實施態樣中，密閉容器包含單一生物反應器。

【0089】在一些實施態樣中，密閉容器包含G-REX-10。

【0090】在一些實施態樣中，密閉容器包含G-REX-

100。

【0091】在一些實施態樣中，在步驟(d)中，抗原呈現細胞(APC)係以25:1至100:1之APC:TIL比例添加至第二TIL族群之細胞培養。

【0092】在一些實施態樣中，細胞培養具有 2.5×10^9 個APC對 100×10^6 個TIL之比例。

【0093】在一些實施態樣中，在步驟(c)中，抗原呈現細胞(APC)係以25:1至100:1之APC:TIL比例添加至第二TIL族群之細胞培養。

【0094】在一些實施態樣中，細胞培養具有 2.5×10^9 個APC對 100×10^6 個TIL之比例。

【0095】本發明亦提供一種用於治療癌症個體之經擴增的TIL族群，其中經擴增的TIL族群係可藉由方法獲得之第三TIL族群，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自個體所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

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

(d) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外

的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二及 / 或第三 TIL 族群暴露至轉錄因子 (TF) 及 / 或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該 TF 及 / 或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性 TIL 族群中增加的腫瘤抗原表現及 / 或增加腫瘤抗原特異性 T 細胞的數量；

(f) 收集獲自步驟 (d) 之該治療性 TIL 族群，其中自步驟 (d) 轉變至步驟 (e) 無需打開該系統而發生；及

(g) 將得自步驟 (e) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (e) 轉移至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；及

(h) 使用冷凍保存過程將包含步驟 (f) 之該經收集的 TIL 族群之該輸注袋視需要冷凍保存。

【0096】 在一些實施態樣中，TIL 族群係用於根據以上及本文所述之方法治療癌症個體，其中方法進一步包含一或多個以上及本文所引述之特徵。

【0097】 本發明亦提供用於判定 TIL 存活性之測定方法。本揭露提供藉由擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成為較大 TIL 族群而用於測定 TIL 存活性之方法，其包含：

(i)獲得先前已擴增之第一 TIL 族群；

(ii)藉由在包含 IL-2 之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群來執行第一擴增以產生第二 TIL 族群；及

(iii)藉由用額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 補充該第二 TIL 族群之細胞培養基來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群於數量上高於該第二 TIL 族群至少 100 倍，其中該第二擴增執行至少 14 天以獲得該第三 TIL 族群，且其中進一步測定該第三 TIL 族群存活性。

【0098】 在一些實施態樣中，方法進一步包含：

(iv)藉由用額外的 IL-2、額外的 OKT-3 及額外的 APC 補充該第三 TIL 族群之細胞培養基來執行額外第二擴增，其中該額外第二擴增執行至少 14 天以獲得比起步驟 (iii) 所獲得者較大的 TIL 族群，且其中進一步測定該第三族群存活性。

【0099】 在一些實施態樣中，在步驟 (i) 之前，細胞係經冷凍保存。

【0100】 在一些實施態樣中，細胞在執行步驟 (i) 之前解凍。

【0101】 在一些實施態樣中，重複步驟 (iv) 一至四次以獲得足夠的 TIL 以供分析。

【0102】 在一些實施態樣中，步驟 (i) 至 (iii) 或 (iv) 在一段約 40 天至約 50 天的期間之內執行。

【0103】 在一些實施態樣中，步驟 (i) 至 (iii) 或 (iv) 在

一段約42天至約48天的期間之內執行。

【0104】在一些實施態樣中，步驟(i)至(iii)或(iv)在一段約42天至約45天的期間之內執行。

【0105】在一些實施態樣中，步驟(i)至(iii)或(iv)在約44天之內執行。

【0106】在一些實施態樣中，來自步驟(iii)或(iv)之細胞以類似於新鮮收集的細胞的水準表現CD4、CD8及TCR $\alpha\beta$ 。

【0107】在一些實施態樣中，抗原呈現細胞係周邊血液單核細胞(PBMC)。

【0108】在一些實施態樣中，PBMC係於步驟(iii)之第9至17天中任一天添加至細胞培養。

【0109】在一些實施態樣中，APC係人工APC (aAPC)。

【0110】在一些實施態樣中，方法進一步包含用包含編碼高親和性T細胞受體之核酸之表現載體轉導第一TIL族群之步驟。

【0111】在一些實施態樣中，轉導步驟發生在步驟(i)之前。

【0112】在一些實施態樣中，方法進一步包含用包含編碼嵌合抗原受體(CAR)之核酸之表現載體轉導第一TIL族群之步驟，該嵌合抗原受體包含與T細胞傳訊分子之至少一個胞內域融合之單鏈可變片段抗體。

【0113】在一些實施態樣中，轉導步驟發生在步驟(i)之前。

【0114】 在一些實施態樣中，測定TIL存活性。

【0115】 在一些實施態樣中，在冷凍保存後測定TIL存活性。

【0116】 在一些實施態樣中，在冷凍保存後及在步驟(iv)後測定TIL存活性。

【0117】 本發明亦提供一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，該方法包含使TIL暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子以產生治療性TIL族群，其中TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供治療性TIL族群中增加的腫瘤抗原表現及/或增加腫瘤抗原特異性T細胞的數量。

【0118】 在一些實施態樣中，蛋白質表現的暫時性改變導致誘導蛋白質表現。

【0119】 在一些實施態樣中，蛋白質表現的暫時性改變導致減少蛋白質表現。

【0120】 在一些實施態樣中，採用一或多種sd-RNA以減少暫時性蛋白質表現。

【0121】 本發明亦提供一種用於評估轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子之方法，其中方法包含擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群、使TIL暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子以產生治療性TIL族群，其中TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供治療性TIL族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞的數量。

【0122】 在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向選自由下列所組成之群組的基因：PD-1、TGFBR2、CBLB (CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受體)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1α)、CCL4 (MIP1-β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1及cAMP蛋白質激酶A (PKA)。

【0123】 在一些實施態樣中，本發明提供一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d) 使該第一TIL族群與至少一種sd-RNA接觸，其中該sd-RNA係以0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL介質、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL介質、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL介質、1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL介質、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL介質、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL介質、2 μM sd-

RNA/10,000個 TIL/100 μ L 介質、5 μ M sd-RNA/10,000個 TIL/100 μ L 介質或10 μ M sd-RNA/10,000個 TIL/100 μ L 介質之濃度添加，且其中該 sd-RNA 係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 及其組合所組成之群組的分子表現；

(e) 視需要對該第一 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(f) 添加 OKT-3 以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約 1 至 3 天以獲得該第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二 TIL 族群靜置約 1 天；

(h) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (h) 無需打開該系統而發生；

(i) 收集獲自步驟 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (h) 轉變至步驟 (i) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(j) 將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (i) 轉移至步驟 (j) 無需打開該系統而發生；

及

(k) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群。

【0124】 在一些實施態樣中，本發明提供一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d) 使該第一TIL族群與至少一種sd-RNA接觸，其中該sd-RNA係以0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL、1 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、2 μM sd-RNA/10,000個TIL、5 μM sd-RNA/10,000個TIL或10 μM sd-RNA/10,000個TIL之濃度添加，且其中該sd-RNA係用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB及其組合所組成之群組的分子表現；

(e) 視需要對該第一TIL族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種sd-RNA之轉移；

(f) 添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增

是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二TIL族群靜置約1天；

(h) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(g)轉變至步驟(h)無需打開該系統而發生；

(i) 收集獲自步驟(h)的該治療性TIL族群以提供經收集的TIL族群，其中自步驟(h)轉變至步驟(i)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(j) 將得自步驟(i)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(i)轉移至步驟(j)無需打開該系統而發生；及

(k) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群。

【0125】 在一些實施態樣中，本發明提供一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含 IL-2 及視需要包含 4-1BB 促效抗體之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群約 2 至 5 天來執行第一擴增；

(d) 添加 OKT-3 以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約 1 至 3 天以獲得該第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二 TIL 族群靜置約 1 天；

(f) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二 TIL 族群在步驟 (d)、(e) 及 / 或 (f) 之任一者的期間與至少一種 sd-RNA 接觸，其中該 sd-RNA 係以 0.1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、0.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、0.75 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、1.25 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、1.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、2 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質或

10 μ M sd-RNA/10,000個 TIL/100 μ L 介質之濃度添加，且其中該 sd-RNA 係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 及其組合所組成之群組的分子表現；

(h) 視需要對該第二 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(i) 收集獲自步驟 (g) 或 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (g) 轉變至步驟 (i) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(j) 將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (i) 轉移至步驟 (j) 無需打開該系統而發生；及

(k) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的 TIL 族群。

【0126】 在一些實施態樣中，本發明提供一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法，其包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含 IL-2 及視需要包含 4-1BB 促效抗體之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群約 2 至 5 天來執行第一擴增；

(d) 添加 OKT-3 以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增

是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二TIL族群靜置約1天；

(f) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(e)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二TIL族群在步驟(d)、(e)及/或(f)之任一者的期間與至少一種sd-RNA接觸，其中該sd-RNA係以0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL、1 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、2 μM sd-RNA/10,000個TIL、5 μM sd-RNA/10,000個TIL或10 μM sd-RNA/10,000個TIL之濃度添加，且其中該sd-RNA係用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB及其組合所組成之群組的分子表現；

(h) 視需要對該第二TIL族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種sd-RNA之轉移；

(i) 收集獲自步驟(g)或(h)的該治療性TIL族群以提供

經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (e) 轉變至步驟 (h) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(j) 將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (h) 轉移至步驟 (i) 無需打開該系統而發生；及

(k) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的 TIL 族群。

【0127】在一些實施態樣中，sd-RNA 在第一擴增期間係以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至第一細胞族群。

【0128】在一些實施態樣中，sd-RNA 在第一擴增期間係以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至第二細胞族群。

【0129】在一些實施態樣中，添加二種 sd-RNA 以用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 所組成之群組的二種分子表現。

【0130】在一些實施態樣中，添加二種 sd-RNA 以用於抑制二種分子表現，其中二種分子係選自由下列所組成之群組：

- i. PD-1 及 LAG-3，

- ii. PD-1及TIM-3，
- iii. PD-1及CISH，
- iv. PD-1及CBLB，
- v. LAG-3及TIM-3，
- vi. LAG-3及CISH，
- vii. LAG-3及CBLB，
- viii. TIM-3及CISH，
- ix. TIM-3及CBLB，及
- x. CISH及CBLB。

【0131】在一些實施態樣中，添加超過二種sd-RNA以用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB所組成之群組的超過二種分子表現。

【0132】在一些實施態樣中，選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB所組成之群組的至少一種分子之表現在與至少一種sd-RNA接觸的TIL中係減少至少80%、85%、90%或95%。

【0133】在一些實施態樣中，選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB所組成之群組的至少一種分子之表現在與至少一種sd-RNA接觸的TIL中係減少至少80%、85%、90%或95%達至少12小時、至少24小時或至少48小時。

【圖式簡單說明】

【0134】圖1：顯示過程2A(22天TIL製造過程)之實施

態樣的圖。

【0135】圖2：顯示用於TIL製造之1C過程與2A過程實施態樣之間的比較。

【0136】圖3：顯示1C過程時間表。

【0137】圖4：顯示用於較高細胞計數之使用TIL製造過程2A之TIL療法實施態樣，包括投予及共療法步驟。

【0138】圖5：顯示用於較低細胞計數之使用TIL製造過程2A之TIL療法實施態樣，包括投予及共療法步驟。

【0139】圖6：顯示2A過程實施態樣的詳細示意圖。

【0140】圖7：描繪過程2A實施態樣的主要步驟，包括冷凍保存步驟。

【0141】圖8：例示性過程2A之圖提供步驟A至F之概覽。

【0142】圖9：過程2A資料收集計畫之程序流程圖。

【0143】圖10：快速擴增規程(REP)例示性實施態樣方案。腫瘤一抵達即經碎斷、放入含IL-2之G-Rex培養瓶進行TIL擴增(REP前擴增)共11天。就三重雞尾酒研究而言，在REP前起始時添加IL-2/IL-15/IL-21。就快速擴增規程(REP)而言，TIL係與餵養細胞及OKT3一起培養，進行額外11天的REP擴增。

【0144】圖11：冷凍保存TIL例示性製造過程(約22天)。

【0145】圖12：顯示過程2A(22天TIL製造過程)之實施態樣的圖。

【0146】圖 13：過程 1C 及過程 2A 之例示性實施態樣的步驟 A 至 F 之比較表。

【0147】圖 14：過程 1C 實施態樣與過程 2A 實施態樣之詳細比較。

【0148】圖 15：描繪冷凍保存 TIL 製造過程 (22 天) 之實施態樣。

【0149】圖 16：第 1 代至第 2 代之過程改良表。

【0150】圖 17：第 2 代冷凍保存 LN-144 製造過程方案。

【0151】圖 18：顯示過程 2A (22 天 TIL 製造過程) 之實施態樣的圖。

【0152】圖 19：顯示無菌接合 (見實例 16 之過程注意事項 5.11) TIL 懸浮液轉移包至重力血液過濾器的底部 (單一管線) 的示意圖。

【0153】圖 20：顯示無菌接合 (見實例 16 之過程注意事項 5.11) 來自 GReX100MCS 的紅色介質移除管線至「上清液」轉移包的示意圖。

【0154】圖 21：顯示將 4S-4M60 接合 (見實例 16 之過程注意事項 5.11) 至 CC2 Cell Connect 之示意圖，用 4S-4M60 歧管在 (G) 處的 4 穿刺針端置換 Cell Connect 設備 (B) 的單一穿刺針。

【0155】圖 22：顯示將中繼器流體轉移組接合 (見實例 16 之過程注意事項 5.11) 至 4S-4M60 的一個公魯爾端之示意圖。

【0156】圖23：顯示將重力血液過濾器的長形末端無菌接合(見實例16之過程注意事項5.11)至LOVO來源袋的示意圖。

【0157】圖24：顯示將過濾器的二個來源管線其中一個無菌接合(見實例16之過程注意事項5.11)至「匯合TIL懸浮液」收集袋之示意圖。

【0158】圖25：顯示將4S-4M60無菌接合(見實例16之過程注意事項5.11)至CC2 Cell Connect之示意圖，用4S-4M60歧管在(G)處的4穿刺針端置換Cell Connect設備(B)的單一穿刺針。

【0159】圖26：顯示將CS750冷凍袋無菌接合(見實例16之過程注意事項5.11)至步驟8.14.8所製備之制具之示意圖，將四個公魯爾端(E)中之一者置換成各袋。

【0160】圖27：顯示將CS-10袋接合(見實例16之過程注意事項5.11)至4S-4M60的穿刺針之示意圖。

【0161】圖28：顯示將「經調配的TIL」袋接合(見實例16之過程注意事項5.11)至步驟8.14.10所製備之設備上剩餘的穿刺針(A)之示意圖。

【0162】圖29：顯示在F(見實例16之過程注意事項5.12)熱封之圖，移除空的滯留物袋及CS-10袋。

【0163】圖30：顯示用於暫時性基因編輯之TIL過程實施態樣之示意圖。

【0164】圖31：顯示用於暫時性基因編輯之TIL過程實施態樣之示意圖。

【0165】圖 32：顯示關於將 RNA 轉移步驟併入 TIL 過程以達暫時性基因重新編程目的之示意圖。

【0166】圖 33：顯示所提議之用於暫時性改變 TIL 中之基因表現的基因工程改造方式概覽。

【0167】圖 34：顯示可對其採用暫時性基因表現改變以改善 TIL 移動至腫瘤部位的趨化激素及趨化激素受體概覽。

【0168】圖 35：顯示可對其採用暫時性基因表現改變以改善 TIL 移動至腫瘤部位的趨化激素及趨化激素受體第二概覽。

【0169】圖 36：顯示例示性自我遞送核糖核酸 (sd-RNA) 實施態樣之示意性結構代表。見 Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018。

【0170】圖 37：顯示例示性 sd-RNA 實施態樣之示意性結構代表。見美國專利公開號 2016/0304873。

【0171】圖 38：顯示使用藉由利用特殊設計引子之 PCR 所獲得之 DNA 模板來合成 mRNA 之例示性方案。前置引子含有適用於體外轉錄之噬菌體啟動子且反置引子含有聚 T 延伸 (stretch)。PCR 產物係適用於體外轉錄之表現卡匣。新生 mRNA 3' 端的聚腺苷酸可預防異常 RNA 跑出 (runoff) 合成且產生雙股 RNA 產物。在轉錄完成後，可由聚 (A) 聚合酶額外延長聚 A 尾。(見美國專利第 8,859,229 號)。

【0172】圖 39：本圖顯示 Sd-rxRNA 媒介之 PDCD1、

TIM3、CBLB、LAG3及CISH的靜默。

【0173】圖40：TIL中Sd-rxRNA媒介之基因靜默；例示性規程。例示性腫瘤包括黑色素瘤(新鮮或冷凍；n=6)、乳房腫瘤(新鮮或冷凍；n=5)、肺腫瘤(n=1)、肉瘤(n=1)及/或卵巢(n=1)。

【0174】圖41：蛋白質表現減少係於5個目標中的4個偵測到。PD1：n=9、TIM3：n=8、LAG3/CISH：n=2、Cbl-b n=2。REP前黑色素瘤及新鮮乳癌TIL製劑，2uM sd-rxRNA。% KD計算為 $(100 - (100 * (\text{關注基因} / \text{NTC})))$ 。

【0175】圖42：Sd-rxRNA誘導之KD隨時間及刺激下降。n=3，REP前黑色素瘤TIL製劑，2uM sd-rxRNA。

【0176】圖43：TIL存活性稍微受到PDCD1 sd-rxRNA的影響。PD1、TIM3 n>6，REP前黑色素瘤/新鮮乳癌TIL製劑。LAG3、CISH n=2，REP前黑色素瘤及乳癌TIL製劑，2uM sd-rxRNA。

【0177】圖44：Sd-rxRNA媒介之PD1及TIM3的KD與指示TIL活化之表型改變相關。n=3，REP前黑色素瘤TIL製劑，2uM sd-rxRNA。

【0178】圖45：由sd-rxRNA進行的PD1及TIM3敲低不影響其他抑制/耗竭標誌的表現。A)及B)n=3，TIM3：n=2，REP前黑色素瘤TIL製劑，2uM sd-rxRNA。

【0179】圖46：PD1及TIM3 KD不顯著改善IFN γ 分泌。n=3，REP前黑色素瘤TIL製劑，2uM sd-rxRNA。

【0180】圖47：CD107a移動不受任何sd-rxRNA影

響。A)n=6，REP前黑色素瘤TIL製劑，2uM sd-rxRNA。B)n=2，REP前黑色素瘤及乳癌TIL製劑，2uM sd-rxRNA。C)n=3，冷凍黑色素瘤及新鮮乳癌TIL。D)n=3，冷凍黑色素瘤及新鮮乳癌及肺癌TIL。E)及F)n=3，乳癌腫瘤新鮮製劑。

【0181】圖48：xCELLigence即時細胞分析(RTCA)。

【0182】圖49：PD1 KD TIL誘發較高殺滅效率。A)殺滅效率代表圖。B)n=3，黑色素瘤TIL，2uM sd-rxRNA之代表圖。

【0183】圖50：Sd-rxRNA劑量反應實驗。A)n=3，乳癌腫瘤新鮮製劑。B)n=3，REP前黑色素瘤TIL製劑。

【0184】圖51：Sd-rxRNA媒介之CBLB敲低無法被偵測到。A)圖。B)流動式細胞測量術測定圖。n=2，REP前黑色素瘤及新鮮乳癌TIL製劑。CBLB的mRNA水準相較於NTC沒有改變。使用流動式細胞測量術測定之Cbl-b的蛋白質水準沒有改變。

【0185】圖52：顯示測試Iovance之TIL製造過程中sd-rxRNA所媒介之基因靜默，評估TIL表型。sd-rxRNA媒介之PD-1敲低與指示TIL活化之表型改變相關。PD-1，n>6，REP前黑色素瘤/新鮮乳癌TIL製劑，2uM sd-rxRNA。B)CD25、CCR7、CD27、CD28、CD56、CD95、4-1BB及OX40。B)CD25、CD56、CCR7、4-1BB及OX40。N=12，新鮮及冷凍TIL；乳房、黑色素瘤、卵巢及肺。

【0186】圖53：PD1 sd-rxRNA添加顯著減少細胞生長

但不減少TIL存活性。A)擴增倍數。B)細胞存活性。n=7，乳房、肉瘤及肺TIL。

【0187】 圖54：PD1 KD不改善因應非特異性刺激之CD107a移動及IFN γ 分泌。A)刺激前及後表現CD107a之CD8細胞的百分比。B)刺激前及後IFN γ 分泌。n=6，黑色素瘤TIL。

序列表簡單說明

【0188】 SEQ ID NO:1係莫羅單抗(muromonab)之重鏈的胺基酸序列。

【0189】 SEQ ID NO:2係莫羅單抗之輕鏈的胺基酸序列。

【0190】 SEQ ID NO:3係重組人IL-2蛋白質之胺基酸序列。

【0191】 SEQ ID NO:4係阿地介白素之胺基酸序列。

【0192】 SEQ ID NO:5係重組人IL-4蛋白質之胺基酸序列。

【0193】 SEQ ID NO:6係重組人IL-7蛋白質之胺基酸序列。

【0194】 SEQ ID NO:7係重組人IL-15蛋白質之胺基酸序列。

【0195】 SEQ ID NO:8係重組人IL-21蛋白質之胺基酸序列。

【0196】 SEQ ID NO:9係人4-1BB之胺基酸序列。

【0197】 SEQ ID NO:10係鼠類4-1BB之胺基酸序列。

【0198】 SEQ ID NO:11係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(utumilumab)(PF-05082566)之重鏈。

【0199】 SEQ ID NO:12係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈。

【0200】 SEQ ID NO:13係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈可變區(VH)。

【0201】 SEQ ID NO:14係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈可變區(VL)。

【0202】 SEQ ID NO:15係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR1。

【0203】 SEQ ID NO:16係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR2。

【0204】 SEQ ID NO:17係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR3。

【0205】 SEQ ID NO:18係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR1。

【0206】 SEQ ID NO:19係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR2。

【0207】 SEQ ID NO:20係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR3。

【0208】 SEQ ID NO:21係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(urelumab)(BMS-663513)之重鏈。

【0209】 SEQ ID NO:22係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞

魯單抗(BMS-663513)之輕鏈。

【0210】 SEQ ID NO:23係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈可變區(VH)。

【0211】 SEQ ID NO:24係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈可變區(VL)。

【0212】 SEQ ID NO:25係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR1。

【0213】 SEQ ID NO:26係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR2。

【0214】 SEQ ID NO:27係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR3。

【0215】 SEQ ID NO:28係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR1。

【0216】 SEQ ID NO:29係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR2。

【0217】 SEQ ID NO:30係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR3。

【0218】 SEQ ID NO:31係TNFRSF促效劑融合蛋白質之Fc結構域。

【0219】 SEQ ID NO:32係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0220】 SEQ ID NO:33係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0221】 SEQ ID NO:34係TNFRSF促效劑融合蛋白質

之連接子。

【0222】 SEQ ID NO:35係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0223】 SEQ ID NO:36係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0224】 SEQ ID NO:37係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0225】 SEQ ID NO:38係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0226】 SEQ ID NO:39係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0227】 SEQ ID NO:40係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0228】 SEQ ID NO:41係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0229】 SEQ ID NO:42係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之Fc結構域。

【0230】 SEQ ID NO:43係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0231】 SEQ ID NO:44係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0232】 SEQ ID NO:45係 TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0233】 SEQ ID NO:46係 4-1BB配體(4-1BBL)胺基酸

序列。

【0234】 SEQ ID NO:47係4-1BBL多肽之可溶部分。

【0235】 SEQ ID NO:48係4-1BB促效劑抗體4B4-1-1版本1之重鏈可變區(VH)。

【0236】 SEQ ID NO:49係4-1BB促效劑抗體4B4-1-1版本1之輕鏈可變區(VL)。

【0237】 SEQ ID NO:50係4-1BB促效劑抗體4B4-1-1版本2之重鏈可變區(VH)。

【0238】 SEQ ID NO:51係4-1BB促效劑抗體4B4-1-1版本2之輕鏈可變區(VL)。

【0239】 SEQ ID NO:52係4-1BB促效劑抗體H39E3-2之重鏈可變區(VH)。

【0240】 SEQ ID NO:53係4-1BB促效劑抗體H39E3-2之輕鏈可變區(VL)。

【0241】 SEQ ID NO:54係人OX40之胺基酸序列。

【0242】 SEQ ID NO:55係鼠類OX40之胺基酸序列。

【0243】 SEQ ID NO:56係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(tavolixizumab)(MEDI-0562)之重鏈。

【0244】 SEQ ID NO:57係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之輕鏈。

【0245】 SEQ ID NO:58係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之重鏈可變區(VH)。

【0246】 SEQ ID NO:59係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之輕鏈可變區(VL)。

【0247】 SEQ ID NO:60係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR1。

【0248】 SEQ ID NO:61係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR2。

【0249】 SEQ ID NO:62係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR3。

【0250】 SEQ ID NO:63係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR1。

【0251】 SEQ ID NO:64係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR2。

【0252】 SEQ ID NO:65係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR3。

【0253】 SEQ ID NO:66係OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈。

【0254】 SEQ ID NO:67係OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈。

【0255】 SEQ ID NO:68係OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈可變區(VH)。

【0256】 SEQ ID NO:69係OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈可變區(VL)。

【0257】 SEQ ID NO:70係OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR1。

【0258】 SEQ ID NO:71係OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR2。

【0259】 SEQ ID NO:72係OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR3。

【0260】 SEQ ID NO:73係OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR1。

【0261】 SEQ ID NO:74係OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR2。

【0262】 SEQ ID NO:75係OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR3。

【0263】 SEQ ID NO:76係OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈。

【0264】 SEQ ID NO:77係OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈。

【0265】 SEQ ID NO:78係OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈可變區(VH)。

【0266】 SEQ ID NO:79係OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈可變區(VL)。

【0267】 SEQ ID NO:80係OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR1。

【0268】 SEQ ID NO:81係OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR2。

【0269】 SEQ ID NO:82係OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR3。

【0270】 SEQ ID NO:83係OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR1。

【 0271 】 SEQ ID NO:84係 OX40促效劑單株抗體 18D8 之輕鏈 CDR2。

【 0272 】 SEQ ID NO:85係 OX40促效劑單株抗體 18D8 之輕鏈 CDR3。

【 0273 】 SEQ ID NO:86係 OX40促效劑單株抗體 Hu119-122之重鏈可變區(VH)。

【 0274 】 SEQ ID NO:87係 OX40促效劑單株抗體 Hu119-122之輕鏈可變區(VL)。

【 0275 】 SEQ ID NO:88係 OX40促效劑單株抗體 Hu119-122之重鏈 CDR1。

【 0276 】 SEQ ID NO:89係 OX40促效劑單株抗體 Hu119-122之重鏈 CDR2。

【 0277 】 SEQ ID NO:90係 OX40促效劑單株抗體 Hu119-122之重鏈 CDR3。

【 0278 】 SEQ ID NO:91係 OX40促效劑單株抗體 Hu119-122之輕鏈 CDR1。

【 0279 】 SEQ ID NO:92係 OX40促效劑單株抗體 Hu119-122之輕鏈 CDR2。

【 0280 】 SEQ ID NO:93係 OX40促效劑單株抗體 Hu119-122之輕鏈 CDR3。

【 0281 】 SEQ ID NO:94係 OX40促效劑單株抗體 Hu106-222之重鏈可變區(VH)。

【 0282 】 SEQ ID NO:95係 OX40促效劑單株抗體 Hu106-222之輕鏈可變區(VL)。

【 0283 】 SEQ ID NO:96 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222 之重鏈 CDR1 。

【 0284 】 SEQ ID NO:97 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222 之重鏈 CDR2 。

【 0285 】 SEQ ID NO:98 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222 之重鏈 CDR3 。

【 0286 】 SEQ ID NO:99 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222 之輕鏈 CDR1 。

【 0287 】 SEQ ID NO:100 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222 之輕鏈 CDR2 。

【 0288 】 SEQ ID NO:101 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222 之輕鏈 CDR3 。

【 0289 】 SEQ ID NO:102 係 OX40 配體 (OX40L) 胺基酸序列 。

【 0290 】 SEQ ID NO:103 係 OX40L 多肽之可溶部分 。

【 0291 】 SEQ ID NO:104 係 OX40L 多肽之替代性可溶部分 。

【 0292 】 SEQ ID NO:105 係 OX40 促效劑單株抗體 008 之重鏈可變區 (VH) 。

【 0293 】 SEQ ID NO:106 係 OX40 促效劑單株抗體 008 之輕鏈可變區 (VL) 。

【 0294 】 SEQ ID NO:107 係 OX40 促效劑單株抗體 011 之重鏈可變區 (VH) 。

【 0295 】 SEQ ID NO:108 係 OX40 促效劑單株抗體 011

之輕鏈可變區(VL)。

【0296】SEQ ID NO:109係OX40促效劑單株抗體021之重鏈可變區(VH)。

【0297】SEQ ID NO:110係OX40促效劑單株抗體021之輕鏈可變區(VL)。

【0298】SEQ ID NO:111係OX40促效劑單株抗體023之重鏈可變區(VH)。

【0299】SEQ ID NO:112係OX40促效劑單株抗體023之輕鏈可變區(VL)。

【0300】SEQ ID NO:113係OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(VH)。

【0301】SEQ ID NO:114係OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(VL)。

【0302】SEQ ID NO:115係OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(VH)。

【0303】SEQ ID NO:116係OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(VL)。

【0304】SEQ ID NO:117係人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(VH)。

【0305】SEQ ID NO:118係人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(VH)。

【0306】SEQ ID NO:119係人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(VL)。

【0307】SEQ ID NO:120係人源化OX40促效劑單株抗

體之輕鏈可變區(VL)。

【0308】SEQ ID NO:121係人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(VH)。

【0309】SEQ ID NO:122係人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(VH)。

【0310】SEQ ID NO:123係人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(VL)。

【0311】SEQ ID NO:124係人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(VL)。

【0312】SEQ ID NO:125係OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(VH)。

【0313】SEQ ID NO:126係OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(VL)。

【實施方式】

I.介紹

【0314】利用快速擴增規程(REP)離體(ex vivo)培養之TIL的過繼性細胞療法已在宿主免疫抑制後的黑色素瘤患者中產生成功的過繼性細胞療法。目前的輸注接受參數依賴TIL之組成的讀數(例如, CD28、CD8或CD4陽性率)及REP產物的擴增倍數及存活性。

【0315】目前的REP規程對於將被輸注至患者的TIL之健康少有深入了解。T細胞從它們的初始狀態(naïve)到效應T細胞的成熟過程期間經歷重大代謝偏移(見Chang, et

al., Nat. Immunol. 2016, 17, 364, 特此明白將全文併入，且特別是關於厭氧及有氧代謝之標誌的討論)。例如，初始T細胞依賴粒線體呼吸來產生ATP，然而成熟、健康的效應T細胞諸如TIL具有高度醣解性，依賴有氧醣解作用來提供它們增生、遷移、活化及抗腫瘤療效所需的生物能基質。

【0316】目前的TIL製造過程受限於長度、成本、無菌性考量及其他本文所述之因子使得將該等過程商業化之潛力嚴重受限，且由於這些和其他原因，在目前尚無可用的商業過程。本發明提供採用暫時性蛋白質表現改變方法之TIL製造過程及基於該等過程之療法，該等過程適用於商業規模製造且經法規核准用於多個臨床中心的人患者。本發明提供用於重新編程TIL以製備具有增加的治療療效之TIL治療性族群之暫時性基因改變過程。

【0317】

II. 定義

【0318】除非另行定義，此處所使用之所有技術及科學用語具有本發明所屬領域之技藝人士所通常瞭解之相同意義。所有在此處提及之專利及公開案係以參照方式被整體納入。

【0319】用語「體內(in vivo)」係指發生在個體身體以內的事件。

【0320】用語「體外(in vitro)」係指發生在個體身體以外的事件。體外測定涵蓋基於細胞的測定，其採用活細

胞或死細胞，且亦可涵蓋不採用完整細胞的不含細胞測定。

【0321】 用語「離體(ex vivo)」係指涉及在從個體身體移除之細胞、組織及/或器官上所進行處理或執行程序的事件。適當地，該細胞、組織及/或器官可利用手術或治療的方法回到個體體內。

【0322】 用語「快速擴增(rapid expansion)」是指抗原特異性 TIL 於數量上在一週期間增加至少約 3 倍(或 4、5、6、7、8、或 9 倍)，更佳的是在一週期間增加至少約 10 倍(或 20、30、40、50、60、70、80、或 90 倍)，或最佳的是在一週期間增加至少約 100 倍。一些快速擴增規程概述於下。

【0323】 在本文中的「腫瘤浸潤淋巴球(tumor infiltrating lymphocytes)」或「TIL」是指原本獲得時是白血球的一細胞族群，這些細胞離開個體的血流且遷移至腫瘤中。TIL 包括但不限於 CD8⁺ 細胞毒性 T 細胞(淋巴球)、Th1 及 Th17 CD4⁺ T 細胞、天然殺手細胞、樹突細胞及 M1 巨噬細胞。TIL 包括初代及繼代 TIL。「初代 TIL」是該些如本文概述之獲自患者組織樣本的細胞(有時稱為「新鮮收集(freshly harvested)」)，而「繼代 TIL」是任何經本文所述之擴增或增生的 TIL 細胞族群，包括但不限於主體 TIL (bulk TIL) 及擴增 TIL(「REP TIL」或「REP 後 TIL」)。TIL 細胞族群可包括基因修飾的 TIL。

【0324】 在本文中的「細胞族群(population of cells)」

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

【0325】 在本文中的「冷凍保存的 TIL」係指在介於約 -150°C 至 -60°C 的範圍內處理及儲存的不論是初代、主體、或擴增 (REP TIL) 的 TIL。冷凍保存的常規方法亦描述於本文他處，包括實例中。為了清晰起見，可將「冷凍保存的 TIL」與可用來作為初代 TIL 來源的冷凍組織樣本區別。

【0326】 在本文中的「解凍的冷凍保存 TIL (thawed cryopreserved TILs)」係指先前經冷凍保存且接著經處理以回到室溫或更高溫度下的 TIL 族群，包括但不限於細胞培養溫度或其中 TIL 可投予至患者的溫度。

【0327】 TIL 通常可經生物化學 (使用細胞表面標誌) 定義，或可藉由彼等浸潤腫瘤及致效治療的能力之功能性定義。TIL 通常可藉由表現一或多個下列生物標記來分類：CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1 及 CD25。此外且替代地，TIL 可藉由彼等重新導入患者體內後浸潤實質腫瘤的能力來進行功能性定義。

【0328】 用語「冷凍保存介質」係指任何可用於冷凍保存細胞的介質。該等介質可包括包含 7% 至 10% DMSO 的

介質。例示性介質包括CryoStor CS10、Hyperthermasol以及其組合。用語「CS10」係指獲自Stemcell Technologies或Biolife Solutions的冷凍保存介質。CS10介質可以其商品名稱「CryoStor® CS10」稱呼。CS10介質是不含血清、不含動物組分的包含DMSO之介質。

【0329】用語「中央記憶T細胞 (central memory T cell)」係指T細胞子集，其在人中為CD45R0+且組成性表現CCR7(CCR7^{hi})及CD62L(CD62^{hi})。中央記憶T細胞的表面表型亦包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)及IL-15R。中央記憶T細胞的轉錄因子包括BCL-6、BCL-6B、MBD2及BMI1。中央記憶T細胞在TCR引發後主要分泌IL-2及CD40L作為效應分子。中央記憶T細胞是主要的血中CD4細胞，且在人的淋巴結及扁桃腺中等比例濃化。

【0330】用語「效應記憶T細胞」係指人或哺乳動物T細胞子集，其就像中央記憶T細胞是CD45R0+，但已經失去組成性表現CCR7的能力(CCR7^{lo})且表現CD62L的能力異質或低(CD62L^{lo})。中央記憶T細胞的表面表型亦包括TCR、CD3、CD127 (IL-7R)及IL-15R。中央記憶T細胞的轉錄因子包括BLIMP1。效應記憶T細胞在抗原刺激後快速分泌高量的發炎性細胞介素，包括干擾素 γ 、IL-4及IL-5。效應記憶T細胞是主要的血中CD8細胞，且在人的肺臟、肝臟及腸道中等比例濃化。CD8+效應記憶T細胞攜帶大量的穿孔素。

【0331】用語「密閉系統」係指與外界環境隔離的系

統。任何適用於細胞培養方法的密閉系統皆可用於本發明之方法。密閉系統包括例如但不限於密閉G容器。一旦將腫瘤區段添加至密閉系統後，該系統即與外界環境隔離，直到準備將TIL投予至患者為止。

【0332】本文中所使用之用語「碎斷(fragmenting)」、「片段(fragment)」及「碎斷的(fragmented)」描述將腫瘤破壞的過程，包括機械碎斷方法諸如破碎、切開、分割及分碎腫瘤組織以及任何其他用於破壞腫瘤組織之物理結構之方法。

【0333】用語「周邊血液單核細胞」及「PBMC」係指具有圓形細胞核的周邊血液細胞，包括淋巴球(T細胞、B細胞、NK細胞)及單核球。較佳地，周邊血液單核細胞係經照射的同種異體周邊血液單核細胞。PBMC是一種抗原呈現細胞。

【0334】用語「抗CD3抗體」係指以成熟T細胞之T細胞抗原受體中的CD3受體為目標的抗體或其變體，例如單株抗體，且包括人、人源化、嵌合或鼠抗體。抗CD3抗體包括OKT-3，亦稱為莫羅單抗。抗CD3抗體亦包括UHCT1株，亦稱為T3及CD3 ϵ 。其他抗CD3抗體包括例如，奧昔珠單抗(otelixizumab)、替利珠單抗(teplizumab)及維西珠單抗(visilizumab)。

【0335】用語「OKT-3」(在本文中亦稱為「OKT3」)係指以成熟T細胞之T細胞抗原受體中的CD3受體為目標的單株抗體或其生物類似物或變體，包括人、人源化、嵌合

或鼠抗體，且包括市售形式諸如 OKT-3(30 ng/mL, MACS GMP CD3 pure, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA)及莫羅單抗或其變體、保守性胺基酸取代、糖化形式或生物類似物。莫羅單抗之重鏈及輕鏈的胺基酸序列在表 1 中給出 (SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2)。能夠產生 OKT-3 的融合瘤寄存於美國菌種保存中心 (American Type Culture Collection)，且所指派之 ATCC 編號為 CRL 8001。能夠產生 OKT-3 的融合瘤亦寄存於歐洲認證細胞培養中心 (ECACC)，且所指派之目錄編號為 86022706。

表 1：莫羅單抗之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:1 莫羅單抗重鏈	QVQLQQSGAE LARFGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNV NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSLSLSEED SAVVYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLLVSSA KTFAPSVYPL APVCGGTGGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPVAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHEPASST KVDKKEPRP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVRGFPYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:2 莫羅單抗輕鏈	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCASASSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSCTSY SLTISGMEAE DAATFYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFFPS YQLTSGGAS VVCFLNFPYF KDINVKWRID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

【0336】用語「IL-2」(在本文中亦稱為「IL2」)係指稱為介白素-2的T細胞生長因子，且包括所有形式的IL-2，包括其人及哺乳動物形式、保守性胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及變體。IL-2係描述於例如 Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88及 Malek, Annu.Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79，彼等揭露皆以引用方式併入本文中。適用於本發明之重組人IL-2的胺基酸序列在表2中給出 (SEQ ID NO:3)。例如，用語IL-2涵蓋人重組形式的IL-2諸如阿地介白素 (PROLEUKIN，可購自多個供應商，每單次使用

小瓶含22百萬IU)，以及由CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA(CELLGRO GMP)或ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA(產品編號CYT-209-b)供應的重組IL-2形式及來自其他供應商的其他市售相等品。阿地介白素(去丙胺醯基-1、經絲胺酸-125取代的人IL-2)係非糖基化人重組形式的IL-2，分子量為大約15 kDa。適用於本發明之阿地介白素的胺基酸序列在表2中給出(SEQ ID NO:4)。用語IL-2亦涵蓋如本文中描述之聚乙二醇化形式的IL-2，包括聚乙二醇化IL2前藥NKTR-214(可購自Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA)。適用於本發明之NKTR-214及聚乙二醇化IL-2係描述於美國專利申請公開案第US 2014/0328791 A1號及國際專利申請公開案WO 2012/065086 A1，彼等揭露以引用方式併入本文中。適用於本發明之替代形式的接合IL-2係描述於美國專利第4,766,106、5,206,344、5,089,261及4902,502號，彼等揭露以引用方式併入本文中。適用於本發明之IL-2調配物係描述於美國專利第6,706,289號，其揭露以引用方式併入本文中。

表 2：介白素之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:3 重組人IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMI LNGIN NYKNPKLTRM LTFKPYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
SEQ ID NO:4 阿地介白素	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID NO:5 重組人IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLTKTI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID NO:6 重組人IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTIIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKRLNDLC FLKRLLEQIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
SEQ ID NO:7 重組人IL-15 (rhIL-15)	MNWNVNISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELELQV ISLESGDASI HDPVENLIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
SEQ ID NO:8 重組人IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRM QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLOKMIHQ HLSRTHGSE DS	60 120 132

【0337】用語「IL-4」(在本文中亦稱為「IL4」)係指稱為介白素4的細胞介素，其係藉由Th2 T細胞及藉由嗜酸性球、嗜鹼性球及肥胖細胞產生。IL-4調節初始(naïve)幫手T細胞(Th0細胞)分化成Th2 T細胞。Steinke and Borish, *Respir. Res.* 2001, 2, 66-70。在IL-4的活化下，Th2 T細胞後續以正向回饋迴圈產生額外IL-4。IL-4亦刺激B細胞增生及第II型MHC表現，且誘導B細胞類型轉換至表現IgE及IgG₁。適用於本發明之重組人IL-4可購自多個供應商，包括ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA(產品編號CYT-211)及ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA(人IL-15重組蛋白質，產品編號Gibco CTP0043)。適用於本發明之重組人IL-4的胺基酸序列在表2中給出(SEQ ID NO:5)。

【0338】用語「IL-7」(在本文中亦稱為「IL7」)係指稱為介白素7的糖基化組織衍生性細胞介素，其可獲自基

質細胞及上皮細胞以及樹突細胞。Fry and Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904。IL-7可刺激T細胞的發育。IL-7與IL-7受體(由IL-7受體 α 及常見 γ 鏈受體組成的異二聚體)結合，其為對於T細胞在胸腺內的發育及在周邊內的存活而言重要的一系列信號。適用於本發明之重組人類IL-7可購自多個供應商，包括ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA(產品編號CYT-254)及ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA(人IL-15重組蛋白質，產品編號Gibco PHC0071)。適用於本發明之重組人IL-7的胺基酸序列在表2中給出(SEQ ID NO:6)。

【0339】用語「IL-15」(在本文中亦稱為「IL15」)係指稱為介白素-15的T細胞生長因子，且包括所有形式的IL-2，包括其人及哺乳動物形式、保守性胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及變體。IL-15係描述於例如Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32，其揭露以引用方式併入本文中。IL-15與IL-2共用 β 及 γ 傳訊受體次單位。重組人IL-15係含有114個胺基酸(及一個N端甲硫胺酸)的單一、非糖基化多肽鏈，分子量為12.8 kDa。重組人IL-15可購自多個供應商，包括ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA(產品編號CYT-230-b)及ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA(人IL-15重組蛋白質，產品編號34-8159-82)。適用於本發明之重組人IL-15的胺基酸序列在表2中給出(SEQ ID NO:7)。

【0340】用語「IL-21」(在本文中亦稱為「IL21」)係

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

【0341】當指示「抗腫瘤有效量」、「腫瘤抑制有效量」或「治療量」時，欲投予之本發明之組成物的精確量可由醫師考慮個體之年齡、體重、腫瘤大小、感染或轉移範圍及患者(個體)病況差異判定。通常說明本文所述之包含腫瘤浸潤性淋巴球(例如繼代TIL或基因修飾的細胞毒性淋巴球)的醫藥組成物可以 10^4 至 10^{11} 細胞/kg體重(例如 10^5 至 10^6 、 10^5 至 10^{10} 、 10^5 至 10^{11} 、 10^6 至 10^{10} 、 10^6 至 10^{11} 、 10^7 至 10^{11} 、 10^7 至 10^{10} 、 10^8 至 10^{11} 、 10^8 至 10^{10} 、 10^9 至 10^{11} 或 10^9 至 10^{10} 細胞/kg體重)的劑量投予，包括在該些範圍內的所有整數值。腫瘤浸潤性淋巴球(在一些情況下包括基因修飾的細胞毒性淋巴球)組成物亦可以這些劑量投予多

次。腫瘤浸潤性淋巴球(在一些情況下包括基因的)可使用在免疫療法中所公知的輸注技術投予(見例如 Rosenberg et al., New Eng. J. of Med.319: 1676, 1988)。對特定患者而言的最佳劑量及治療方案可輕易地由所屬醫學技術領域中具有通常知識者藉由監測患者的疾病徵候且據此調整治療加以判定。

【0342】用語「血液惡性病」係指哺乳動物造血及淋巴組織(包括但不限於血液、骨髓、淋巴結及淋巴系統的組織)的癌症及腫瘤。血液惡性病亦稱為「液體腫瘤」。血液惡性病包括但不限於急性淋巴母細胞白血病(ALL)、慢性淋巴球性淋巴瘤(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核球性白血病(AMoL)、何杰金氏淋巴瘤及非何杰金氏淋巴瘤。用語「B細胞血液惡性病」係指影響B細胞的血液惡性病。

【0343】用語「實質腫瘤」係指組織的異常團塊，通常不含囊腫或液體區域。實質腫瘤可為良性或惡性。用語「實質腫瘤癌」係指惡性、腫瘤性或癌性實質腫瘤。實質腫瘤癌包括但不限於肉瘤、癌(carcinoma)及淋巴瘤，諸如肺癌、乳癌、前列腺癌、結腸癌、直腸癌及膀胱癌。實質腫瘤的組織結構包括相互依賴的組織隔室，包括實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支持性微環境的支持性基質細胞。

【0344】用語「液體腫瘤」係指具流體本質之細胞的

異常團塊。液體腫瘤癌症包括但不限於白血病、骨髓瘤及淋巴瘤以及其他血液惡性病。獲自液體腫瘤的TIL在本文中亦稱為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【0345】如本文中所使用之用語「微環境」可指整個實質或血液腫瘤微環境或可指在微環境中的個別細胞子集。如本文中所使用之腫瘤微環境係指如 Swartz, et al., *Cancer Res.*, 2012, 72, 2473所描述之一種「促進腫瘤性轉換、支持腫瘤生長及入侵、保護腫瘤不受宿主免疫力影響、鼓勵治療抗性且提供顯性轉移成長空間的細胞、可溶因子、傳訊分子、細胞外基質及機械刺激」的複雜混合物。雖然腫瘤表現出應被T細胞辨識的抗原，但免疫系統因為微環境的免疫抑制作用而很少進行腫瘤廓清。

【0346】在一實施態樣中，本發明包括用TIL族群治療癌症之方法，其中患者在根據本發明輸注TIL之前先經非骨髓清除式化療治療。在一些實施態樣中，可提供rTIL族群，其中患者在根據本發明輸注TIL之前先經非骨髓清除式化療治療。在一實施態樣中，非骨髓清除式化療係環磷醯胺 60 mg/kg/d共2天(TIL輸注之前第27及26天)及氟達拉濱 25 mg/m²/d共5天(TIL輸注之前第27至23天)。在一實施態樣中，在根據本發明之非骨髓清除式化療及TIL輸注(第0天)之後，患者每8小時接受720,000 IU/kg靜脈內IL-2的靜脈內輸注至生理耐受。

【0347】實驗發現指示在過繼性轉移腫瘤特異性T淋巴球之前，藉由清除調節T細胞且競爭免疫系統的元件

(「細胞介素匯(cytokine sinks)」)進行淋巴球耗盡扮演增強治療療效的關鍵角色。因此，本發明之一些實施態樣在導入本發明之rTIL之前，對患者進行淋巴球耗盡步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調理」)。

【0348】如本文中所使用之用語「共投」、「共同投予」、「與...組合投予」、「同時」及「併用」涵蓋投予二或更多種活性醫藥成分(在本發明之較佳實施態樣中，例如至少一種鉀通道促效劑與複數個TIL之組合)至個體，以使兩種活性醫藥成分及/或彼等之代謝物同時存在於個體中。共投包括同時投予分開組成物、在不同時間投予分開組成物或投予其中有二或更多種活性醫藥成分存在的組成物。同時投予分開組成物及投予其中有兩種藥劑存在的組成物係為較佳。

【0349】用語「有效量」或「治療有效量」係指足以致效意圖應用包括但不限於疾病治療之如本文中描述之化合物或化合物組合的量。治療有效量可依意圖應用(體外或體內)或所欲治療之個體及疾病病況(例如個體的體重、年齡及性別)、疾病病況的嚴重性或投予方式而異。該用語亦適用於將誘導目標細胞中之特定反應(例如減少血小板黏著性及/或細胞遷移)的劑量。明確劑量將視所選之特定化合物、所遵循之給藥方案、化合物是否與其他化合物組合投予、投予時間點、其欲投予之組織及攜帶化合物之物理遞送系統而異。

【0350】用語「治療」及類似用語係指獲得所欲藥理

學及/或生理學效應。該效應可為預防性，也就是完全或部分預防疾病或其症狀，及/或該效應可為治療性，也就是部分或完全治癒疾病及/或疾病帶來的不良影響。本文所使用之「治療」涵蓋對哺乳動物(特別是人)疾病之任何治療，且包括：(a)預防疾病在個體發生，該個體可為易發生該疾病但尚未被診斷為已有該疾病者；(b)抑制疾病，即停止疾病的發展或進展；及(c)緩解疾病，即造成疾病消退及/或緩解一或多種疾病症狀。「治療」亦涵蓋遞送藥劑以提供藥理學效應，甚至在疾病或病況不存在下。例如，「治療」涵蓋遞送可在疾病病況不存在下誘發免疫反應或授予免疫力之組成物，例如以疫苗為例。

【0351】 當用語「異源性」用於指稱核酸或蛋白質的部分時，表示該核酸或蛋白質包含二或更多個在天然中不具有相同相互關係的子序列。舉例而言，該核酸一般為重組產生且具有二或更多個來自不相關基因且經排列以製造新的功能性核酸的序列，例如啟動子來自一個來源且編碼區域來自另一來源，或編碼區域來自不同來源。類似地，異源性蛋白質表示該蛋白質包含二或更多個在天然中不具有相同相互關係的子序列(例如融合蛋白質)。

【0352】 在提及二或多個核酸或多肽時，用語「序列一致性(sequence identity)」、「一致性百分比(percent identity)」及「序列一致性百分比(sequence percent identity)」(或其同義用語，例如「99%一致性」)係指當二或更多個序列或子序列經比較及排比(需要時導入間格)以達最高對

應性且不把任何保守性胺基酸取代當作序列一致性之部分時，該二或多個序列或子序列係相同或具有相同之特定百分比之核苷酸或胺基酸殘基。一致性百分比可利用序列比較軟體或演算法測量，或藉由目視檢查測量。各種演算法及軟體係所屬技術領域中已知，可用於獲得胺基酸或核苷酸序列之排比。可判定序列一致性百分比之合適程式包括例如可得自美國政府的國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)BLAST網站的BLAST套裝程式。兩個序列之間的比較可使用BLASTN或BLASTP演算法進行。BLASTN是用來比較核酸序列，而BLASTP是用來比較胺基酸序列。ALIGN、ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California)或MegAlign(可得自DNASTAR)是其他可供大眾使用的排比序列軟體程式。所屬技術領域中具有通常知識者可判定用於特定排比軟體以求最大排比的適當參數。在某些實施態樣中，使用排比軟體的內建參數。

【0353】如本文中所使用，用語「變體」涵蓋但不限於包含與參考抗體的胺基酸序列不同之胺基酸序列的抗體或融合蛋白質，該不同處在於在該參考抗體的胺基酸序列之內或相鄰的某些位置有一或多個取代、刪除及/或添加。相較於參考抗體的胺基酸序列，變體的胺基酸序列中可包含一或多個保守性取代。保守性取代可涉及例如類似地帶電或不帶電胺基酸的取代。變體保留與參考抗體之抗原特異性結合的能力。用語變體亦包括聚乙二醇化抗體或蛋白質。

【0354】在本文中的「腫瘤浸潤淋巴球 (tumor infiltrating lymphocytes)」或「TIL」是指原本獲得時是白血球的一細胞族群，這些細胞離開個體的血流且遷移至腫瘤中。TIL包括但不限於CD8⁺細胞毒性T細胞(淋巴球)、Th1及Th17 CD4⁺ T細胞、天然殺手細胞、樹突細胞及M1巨噬細胞。TIL包括初代及繼代TIL。「初代TIL」是該些如本文概述之獲自患者組織樣本(有時稱為「新鮮收集(freshly harvested)」)的TIL，而「繼代TIL」是任何經本文所述之擴增或增生的TIL細胞族群，包括但不限於主體TIL、擴增TIL(「REP TIL」)以及如此處討論的「reREP TIL」。reREP TIL可包括例如第二擴增TIL或第二額外擴增TIL(諸如例如該些於圖8步驟D中描述者，包括稱為reREP TIL之TIL)。

【0355】TIL通常可經生物化學(使用細胞表面標誌)定義，或可藉由彼等浸潤腫瘤及致效治療的能力之功能性定義。TIL通常可藉由表現一或多個下列生物標記來分類：CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1及CD25。此外且替代地，TIL可藉由彼等重新導入患者體內後浸潤實質腫瘤的能力來進行功能性定義。TILS可進一步藉由效力表徵-例如，如果例如干擾素(IFN)釋放大於約50 pg/mL、大於約100 pg/mL、大於約150 pg/mL或大於約200 pg/mL，則TILS可被認為有效。

【0356】用語「去氧核糖核苷酸」涵蓋天然及合成的、未經修飾及經修飾的去氧核糖核苷酸。修飾包括改變

糖部份、鹼基部份及/或寡核苷酸中的去氧核糖核苷酸之間的鍵聯。

【0357】 用語「RNA」定義包含至少一個核糖核苷酸殘基的分子。用語「核糖核苷酸」定義在b-D-核呔喃糖部份的2'位置具有羥基的核苷酸。用語RNA包括雙股RNA、單股RNA、單離RNA諸如部分純化的RNA、基本上純的RNA、合成的RNA、重組產生的RNA以及藉由添加、刪除、取代及/或改變一或多個核苷酸而與天然發生RNA不同之經改變的RNA。本文所述之RNA分子的核苷酸亦可包含非標準核苷酸，諸如非天然發生的核苷酸或化學合成的核苷酸或去氧核苷酸。這些經改變的RNA可稱為類似物或天然發生的RNA之類似物。

【0358】 用語「經修飾的核苷酸」係指具有一或多個對核苷、核鹼基、五碳糖環或磷酸基團之修飾的核苷酸。例如，經修飾的核苷酸排除含有單磷酸腺苷、單磷酸鳥苷、單磷酸尿苷及單磷酸胞苷之核糖核苷酸及含有單磷酸去氧腺苷、單磷酸去氧鳥苷、單磷酸去氧胸苷及單磷酸去氧胞苷之去氧核糖核苷酸。修飾包括該些天然發生者，其係由修飾核苷酸之酶諸如甲基轉移酶所進行之修飾導致。

【0359】 經修飾的核苷酸亦包括合成的或非天然發生的核苷酸。合成的或非天然發生的核苷酸修飾包括該些具有2'修飾者，例如2'-O-甲基、2'-甲氧基乙氧基、2'-氟基、2'-烯丙基、2'-O-[2-(甲基胺基)-2-側氧基乙基]、4'-硫基、4'-CH₂-O-2'-橋(bridge)、4'-(CH₂)₂-O-2'-橋、2'-

LNA及2'-O--(N-甲基胺甲酸酯)或該些包含鹼基類似物者。關於本揭露所述之2'-經修飾的核苷酸，所謂「胺基」係指2'-NH₂或2'-O--NH₂，其可經修飾或未經修飾。該等經修飾的基團係描述於例如美國專利第5,672,695號及第6,248,878號；以引用方式併入本文中。

【0360】用語「微小RNA (microRNA)」或「miRNA」係指形成單股RNA之核酸，當miRNA與基因或目標基因表現於相同細胞中時，該單股RNA具有改變該基因或目標基因表現(減少或抑制表現；調節表現；直接或間接增強表現)的能力。在一實施態樣中，miRNA係指與目標基因具有實質或完全一致性且形成單股miRNA之核酸。在一些實施態樣中，miRNA可呈前-miRNA之形式，其中該前-miRNA係雙股RNA。miRNA之序列可對應全長目標基因或其子序列。一般而言，miRNA係至少約15至50個核苷酸長(例如單股miRNA之各序列係15至50個核苷酸長，且雙股前-miRNA係約15至50個鹼基對長)。在一些實施態樣中，miRNA係20至30個鹼基核苷酸。在一些實施態樣中，miRNA係20至25個核苷酸長。在一些實施態樣中，miRNA係20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個核苷酸長。

【0361】用語「目標基因」包括已知或識別為調節涉及免疫抗性機制之基因表現的基因且可為數種基因群組中之一者，諸如抑制性受體例如CTLA4及PD1；去活化免疫細胞之細胞介素受體例如TGF- β 受體、LAG3及/或TIM3及

其組合。在一些實施態樣中，目標基因包括下列一或多者：PD-1、TGFBR2、CBLB(CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受體)IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2細胞內結構域(ICD)、NOTCH配體mDLL1、TIM3、LAG3、TIGIT、TGF β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1 α)、CCL4(MIP1- β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1及/或cAMP蛋白質激酶A(PKA)。

【0362】片語「小干擾RNA」或「siRNA」或「短干擾RNA」或「靜默RNA」定義一群雙股RNA分子，包含同義及反義RNA股，各股通常為約1022個核苷酸長，視需要包括1至3個核苷酸之3'懸端。siRNA在RNA干擾(RNAi)途徑中具有活性，且利用互補核苷酸序列干擾特定目標基因的表現。

【0363】用語sd-RNA係指形成為不對稱雙股RNA-反義寡核苷酸雜交物之「可自我遞送」RNAi劑。雙股RNA包括約19至25個核苷酸之引導(同義)股及約10至19個核苷酸之乘客(反義)股，其形成雙股且導致約5至9個核苷酸之單股硫代磷酸化尾。在一些實施態樣中，RNA序列可經穩定及疏水性修飾諸如固醇例如膽固醇、維生素D、萘基、異丁基、苜基、吡啶、色胺酸及苯基的修飾，該修飾授予在任何轉染試劑或調配物不存在下的穩定性及有效細胞攝取性。在一些實施態樣中，測試IFN誘導之蛋白質的免疫

反應測定指示 sd-RNA 相較於其他 RNAi 劑產生減少的免疫刺激輪廓。見例如 Byrne et al., December 2013, *J. Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 29(10): 855-864, 以引用方式併入本文中。在一些實施態樣中, 本文所述的 sd-RNA 可購自 Advirna LLC, Worcester, MA, USA。

【0364】用語「醫藥上可接受之載劑」或「醫藥上可接受之賦形劑」意圖包括任何及所有溶劑、分散介質、包覆劑、抗菌劑、抗真菌劑、等滲劑、吸收延緩劑及惰性成分。活性醫藥成分所使用的該等醫藥上可接受之載劑或醫藥上可接受之賦形劑係所屬技術領域中廣知的。除非任何習用醫藥上可接受之載劑或醫藥上可接受之賦形劑與活性醫藥成分不相容, 彼於本發明之治療組成物中之用途係經考慮。額外活性醫藥成分(諸如其他藥物)亦可併入所述之組成物及方法中。

【0365】用語「約」或「大約」係指在一數值之具統計意義之範圍內。該範圍可在給定數值或範圍之一數量級之內, 較佳在 50% 以內, 更佳在 20% 以內, 又更佳在 10% 以內, 甚至更佳在 5% 以內。用語「約」或「大約」所涵蓋之允許偏差依特定研究系統而定, 且可被該領域之一般技藝人士輕易地了解。再者, 如本文中所使用之用語「約」及「大約」意指尺寸、大小、調配物、參數、形狀及其他數量及特徵並不確切而且不需要確切, 但可視需要為近似值及/或較大或較小值, 反映出公差、轉換因子、四捨五入、測量誤差及類似值及所屬技術領域中具有通常

知識者已知之其他因子。一般來說，尺寸、大小、調配物、參數、形狀或其他數量或特徵皆為「約」或「大約」，無論是否如此明白說明。已注意到非常不同大小、形狀及尺寸的實施態樣可採用所述的安排。

【0366】當轉折語「包含」、「基本上由...組成 (consisting essentially of)」及「由...組成 (consisting of)」以原始及修改形式用於隨附申請專利範圍中時，其就請求範圍定義有關於哪些未引述之額外請求元件或步驟(若有的話)被排除於請求項之範圍之外。用語「包含」意圖為包括性或開放式且不排除任何額外、未引述元件、方法、步驟或材料。用語「由...組成」排除任何不在請求項中指明之元件、步驟或材料，且在後者情況中排除與所指明之材料尋常相關之雜質。用語「基本上由...組成」將請求項的範圍限制在所指明的元件、步驟或材料及該些實質上不影響所主張發明之基本及新穎特徵者。本文所述之體現本發明之所有組成物、方法及套組可在替代性實施態樣中藉由任何轉折語「包含」、「基本上由...組成」及「由...組成」更具體地定義。

III. 暫時性改變TIL中之蛋白質表現的方法

【0367】在一些實施態樣中，本發明之擴增TIL在擴增步驟之前、之期間或之後包括在密閉、無菌製造過程期間(各提供於本文中)經進一步操作以改變蛋白質表現。在一些實施態樣中，暫時性改變的蛋白質表現是因為暫時性

基因編輯。在一些實施態樣中，本發明之擴增 TIL 用轉錄因子 (TF) 及 / 或其他能夠暫時性改變 TIL 中之蛋白質表現的分子處理。在一些實施態樣中，TF 及 / 或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供 TIL 族群中改變的腫瘤抗原表現及 / 或改變腫瘤抗原特異性 T 細胞的數量。

【0368】 在一些實施態樣中，本發明包括經由核苷酸插入 TIL 族群之基因編輯，諸如經由核糖核酸 (RNA) 插入，包括插入傳訊 RNA (mRNA) 或小 (或短) 干擾 RNA (siRNA)，以促進一或多個蛋白質的表現或抑制一或多個蛋白質的表現以及同時促進一組蛋白質與抑制另一組蛋白質的組合。

【0369】 在一些實施態樣中，本發明之擴增 TIL 經歷蛋白質表現的暫時性改變。在一些實施態樣中，蛋白質表現的暫時性改變發生在第一擴增之前的主體 TIL 族群，包括例如在獲自例如圖 8 所示之步驟 A 的 TIL 族群中。在一些實施態樣中，蛋白質表現的暫時性改變發生在第一擴增期間，包括例如在例如圖 8 所示之步驟 B 擴增的 TIL 族群中。在一些實施態樣中，蛋白質表現的暫時性改變發生在第一擴增之後，包括例如在第一至第二擴增之間轉變的 TIL 族群中、獲自例如圖 8 所示之步驟 B 且包括於步驟 C 之 TIL 族群。在一些實施態樣中，蛋白質表現的暫時性改變發生在第二擴增之前的主體 TIL 族群，包括例如在獲自例如圖 8 所示之步驟 C 且在彼之步驟 D 擴增之前的 TIL 族群中。在一些實施態樣中，蛋白質表現的暫時性改變發生在第二擴增期間，包括例如在例如圖 8 所示之步驟 D 擴增的 TIL 族群中。

在一些實施態樣中，蛋白質表現的暫時性改變發生在第二擴增之後，包括例如在獲自例如圖8所示之步驟D擴增的TIL族群中。

【0370】在一實施態樣中，暫時性改變TIL族群蛋白質表現之方法包括電穿孔的步驟。在一實施態樣中，暫時性改變TIL族群中之蛋白質表現的方法係根據圖30及圖31所描繪之方法執行。電穿孔方法係所屬技術領域中已知且描述於例如Tsong, *Biophys. J.* 1991, 60, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，彼等各者之揭露以引用方式併入本文中。在一實施態樣中，暫時性改變TIL族群蛋白質表現之方法包括磷酸鈣轉染的步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣DNA沉澱、細胞表面塗層及胞飲作用)係所屬技術領域中已知且描述於Graham and van der Eb, *Virology* 1973, 52, 456-467；Wigler, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76, 1373-1376及Chen and Okayarea, *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7, 2745-2752；及美國專利第5,593,875號，彼等各者之揭露以引用方式併入本文中。在一實施態樣中，暫時性改變TIL族群蛋白質表現之方法包括脂質體轉染的步驟。脂質體轉染方法諸如採用在過濾水中之陽離子脂質N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-n,n,n-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油烯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)之1:1 (w/w)脂質體調配物的方法係所屬技術領域中已知且描述於Rose, et al., *Biotechniques* 1991, 10, 520-525及Felgner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 7413-7417及美國專利

第 5,279,833 ; 5,908,635 ; 6,056,938 ; 6,110,490 ; 6,534,484 及 7,687,070 號，彼等各者之揭露以引用方式併入本文中。在一實施態樣中，暫時性改變 TIL 族群蛋白質表現之方法包括使用美國專利第 5,766,902 ; 6,025,337 ; 6,410,517 ; 6,475,994 及 7,189,705 號所述之方法的轉染步驟；彼等各者之揭露以引用方式併入本文中。

【0371】 在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致幹記憶 T 細胞 (TSCM) 增加。TSCM 是抗原經歷中央記憶 T 細胞的早期祖細胞。TSCM 通常顯示定義幹細胞的長期存活、自我再生及多能能力，且通常為產製有效 TIL 產物之所欲。TSCM 在過繼性細胞轉移的小鼠模型中已顯示相較於其他 T 細胞子集增強的抗腫瘤活性 (Gattinoni et al. Nat Med 2009, 2011; Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012; Cieri et al. Blood 2013)。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致具有包含高比例的 TSCM 之組成物的 TIL 族群。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致 TSCM 百分比增加至少 5%、至少 10%、至少 10%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95%。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致 TIL 族群中的 TSCM 增加至少 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致具有至少 5%、至少 10%、至少 10%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至

少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%之 TSCM 的 TIL 族群。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致具有至少 5%、至少 10%、至少 10%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%之 TSCM 的治療性 TIL 族群。

【0372】在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致抗原經歷 T 細胞回春(rejuvenation)。在一些實施態樣中，回春包括例如增加增生、增加 T 細胞活化及/或增加抗原辨識。

【0373】在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現改變 T 細胞一大組份的表現，以保留腫瘤衍生之 TCR 貯庫。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現不改變腫瘤衍生之 TCR 貯庫。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現維持腫瘤衍生之 TCR 貯庫。

【0374】在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質導致改變特定基因的表現。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向包括但不限於下列基因：PD-1(亦稱為 PDCD1 或 CD279)、TGFBR2、CCR4/5、CBLB (CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受體)、IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGF β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、

CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1及/或cAMP蛋白質激酶A(PKA)。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向選自由下列所組成之群組的基因：PD-1、TGFB2、CCR4/5、CBLB (CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受體)、IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGF β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1及/或cAMP蛋白質激酶A (PKA)。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向PD-1。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向TGFB2。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR4/5。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CBLB。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CISH。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR(嵌合共刺激受體)。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-2。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-7。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-10。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-12。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-15。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋

白質表現靶向IL-21。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向NOTCH 1/2 ICD。

【0375】在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向NOTCH傳訊途徑，諸如經由NOTCH 1/2 ICD及/或經由其他NOTCH配體諸如mDLL1(見例如Kondo, T. et al., NOTCH-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy, Nature Communications, Vol. 8, Article number: 15338 (2017)，其全文以引用方式併入本文中)。

【0376】在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向TIM3。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向LAG3。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向TIGIT。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向TGF β 。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR1。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR2。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR4。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR5。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCR1。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCR2。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CSCR3。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL2 (MCP-1)。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL3 (MIP-1 α)。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL4 (MIP1- β)。在一些實施態樣

中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL5 (RANTES)。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCL1。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCL8。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL22。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL17。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向VHL。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向CD44。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向PIK3CD。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向SOCS1。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向cAMP蛋白質激酶A (PKA)。

【0377】 在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致趨化激素受體增加及/或過度表現。在一些實施態樣中，因暫時性蛋白質表現而過度表現的趨化激素受體包括配體包括但不限於CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22及/或CCL17之受體。在一些實施態樣中，因暫時性蛋白質表現而過度表現的趨化激素受體包括配體包括但不限於IL-2、IL-7、IL-10、IL-15及IL-21，還有NOTCH 1/2細胞內結構域(ICD)。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向NOTCH傳訊途徑，諸如經由NOTCH 1/2 ICD及/或經由其他NOTCH配體諸如mDLL1(見例如Kondo, T. et al., NOTCH-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy,

Nature Communications, Vol. 8, Article number: 15338 (2017), 其全文以引用方式併入本文中)。

【0378】 在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβ₂及/或TGFβ的表現降低及/或減少(包括導致例如TGFβ途徑阻斷)。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致CBLB (CBL-B)的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH的表現降低及/或減少。

【0379】 在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致趨化激素受體增加及/或過度表現，以例如改善TIL移動或運動至腫瘤部位。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致CCR(嵌合共刺激受體)增加及/或過度表現。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2及/或CSCR3所組成之群組的趨化激素受體增加及/或過度表現。

【0380】 在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致介白素增加及/或過度表現。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由IL-2、IL-12、IL-15及/或IL-21所組成之群組的介白素增加及/或過度表現。

【0381】 在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現靶向NOTCH傳訊途徑，諸如經由NOTCH 1/2 ICD及/或經由其他NOTCH配體諸如mDLL1(見例如Kondo, T. et al.,

NOTCH-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy, Nature Communications, Vol. 8, Article number: 15338 (2017), 其全文以引用方式併入本文中)。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致NOTCH 1/2 ICD增加及/或過度表現。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致NOTCH配體諸如mDLL1增加及/或過度表現。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致VHL增加及/或過度表現。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致CD44增加及/或過度表現。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致PIK3CD增加及/或過度表現。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致SOCS1增加及/或過度表現。

【0382】在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致cAMP蛋白質激酶A (PKA)的表現降低及/或減少。

【0383】在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的分子的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的二個分子的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及選自由LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、

TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (Br3)及其組合所組成之群組的一個分子的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3及其組合的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其組合中之一者的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及LAG3的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及CISH的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及CBLB的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG3及CISH的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG3及CBLB的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH及CBLB的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及PD-1的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及LAG3的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及CISH的表現降低及/或減少。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及CBLB的表現降低及/或減少。

【0384】在一些實施態樣中，選自由CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合所組成之群組的黏著性分子藉由 γ 逆轉錄病毒或慢病毒方法插入第一TIL

族群、第二TIL族群或經收集的TIL族群(例如黏著性分子的表現增加)。

【0385】在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的分子的表現降低及/或減少，及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合的表現增加及/或增強。在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由PD-1、LAG3、TIM3、CISH、CBLB及其組合所組成之群組的分子的表現降低及/或減少，及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合的表現增加及/或增強。

【0386】在一些實施態樣中，表現減少約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約85%、約90%或約95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約80%。在一些實施態樣中，表現減少至少約85%。在一些實施態樣中，表現減少至少約90%。在一些實施態樣中，

表現減少至少約95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約99%。

【0387】在一些實施態樣中，表現增加約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施態樣中，表現增加至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施態樣中，表現增加至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施態樣中，表現增加至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施態樣中，表現增加至少約85%、約90%或約95%。在一些實施態樣中，表現增加至少約80%。在一些實施態樣中，表現增加至少約85%。在一些實施態樣中，表現增加至少約90%。在一些實施態樣中，表現增加至少約95%。在一些實施態樣中，表現增加至少約99%。

【0388】在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現係藉由用轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變TIL中之蛋白質表現的分子處理TIL來誘導。在一些實施態樣中，採用無SQZ載體之微流體平台進行轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子的細胞內遞送。該等證實遞送蛋白質(包括轉錄因子)至多種初代人細胞(包括T細胞)之能力的方法(Sharei et al. PNAS 2013以及 Sharei et al. PLOS ONE 2015及 Greisbeck et al. J. Immunology vol. 195,

2015)已經描述，包括使用微流體狹窄變形細胞以使TF或其他分子進入細胞之快速方法；見例如，國際專利申請案公開號WO 2013/059343A1、WO 2017/008063A1或WO 2017/123663A1或美國專利申請案公開號US 2014/0287509A1、US 2018/0201889A1或US 2018/0245089A1，所有全文皆以引用方式併入本文中。該等描述於國際專利申請案公開號WO 2013/059343A1、WO 2017/008063A1或WO 2017/123663A1或美國專利申請案公開號US 2014/0287509A1、US 2018/0201889A1或US 2018/0245089A1之方法可為本發明所採用，以暴露TIL族群至轉錄因子(TF)及/或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現的分子，其中TF及/或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現的分子提供增加腫瘤抗原的表現及/或增加TIL族群中腫瘤抗原特異性T細胞的數量，因此導致TIL族群的重新編程及經重新編程之TIL族群相較於未重新編程之TIL族群的治療療效增加。在一些實施態樣中，重新編程導致效應T細胞及/或中央記憶T細胞子族群相對於如本文所述之TIL的起始或先前(即在重新編程之前)族群增加。

【0389】 在一些實施態樣中，轉錄因子(TF)包括但不限於TCF-1、NOTCH 1/2 ICD及/或MYB。在一些實施態樣中，轉錄因子(TF)係TCF-1。在一些實施態樣中，轉錄因子(TF)係NOTCH 1/2 ICD。在一些實施態樣中，轉錄因子(TF)係MYB。在一些實施態樣中，轉錄因子(TF)係與誘導多能幹細胞培養(iPSC)諸如市售KNOCKOUT Serum Replacement

(Gibco/ThermoFisher)一起投予，以誘導額外的TIL重新編程。在一些實施態樣中，轉錄因子(TF)係與iPSC雞尾酒一起投予，以誘導額外的TIL重新編程。在一些實施態樣中，轉錄因子(TF)不與iPSC雞尾酒一起投予。在一些實施態樣中，重新編程導致TSCM的百分比增加。在一些實施態樣中，重新編程導致TSCM的百分比增加約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%的TSCM。

【0390】在一些實施態樣中，用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

- (i) 自患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；
- (ii) 藉由在包含IL-2及視需要OKT-3之細胞培養基中培養該第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群；
- (iii) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL族群之細胞培養基來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第三TIL族群於數量上高於該第二TIL族群至少100倍，且其中該第二擴增執行至少14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群；及
- (iv) 使該第二及/或第三TIL族群暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性TIL族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異

性T細胞的數量。

【0391】在一實施態樣中，用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d) 添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 對該第二TIL族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介至少一種短干擾RNA或一種傳訊RNA之轉移；

(f) 使該第二TIL族群靜置約1天；

(g) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(f)轉變至步驟(g)無需打開該系統而發生；

(h) 收集獲自步驟(g)的該治療性TIL族群以提供經收集的TIL族群，其中自步驟(g)轉變至步驟(h)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(i) 將得自步驟(e)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(e)轉移至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(j) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群，

其中該無菌電穿孔步驟包含遞送用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的分子表現之短干擾RNA。

【0392】 根據一實施態樣，用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d) 添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其

中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 對該第二TIL族群執行SQZ微流體膜破壞步驟，其中該SQZ微流體膜破壞步驟媒介至少一種短干擾RNA或一種傳訊RNA之轉移；

(f) 使該第二TIL族群靜置約1天；

(g) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(f)轉變至步驟(g)無需打開該系統而發生；

(h) 收集獲自步驟(g)的該治療性TIL族群以提供經收集的TIL族群，其中自步驟(g)轉變至步驟(h)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(i) 將得自步驟(e)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(e)轉移至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(j) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群，

其中該SQZ微流體膜破壞步驟包含遞送用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的分子表現之短干擾RNA。

【0393】 在一些實施態樣中，如上述之暫時性改變蛋

白質表現如上述之方法可與基因修飾 TIL 族群之方法組合，包括穩定併入基因以產生一或多種蛋白質的步驟。在一實施態樣中，基因修飾 TIL 族群之方法包括逆轉錄病毒轉導的步驟。在一實施態樣中，基因修飾 TIL 族群之方法包括慢病毒轉導的步驟。慢病毒轉導系統係所屬技術領域中已知且描述於例如 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 及美國專利第 6,627,442 號，彼等各者之揭露以引用方式併入本文中。在一實施態樣中，基因修飾 TIL 族群之方法包括 γ 逆轉錄病毒轉導的步驟。 γ 逆轉錄病毒轉導系統係所屬技術領域中已知且描述於例如 Cepko and Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* 1996, 9.9.1-9.9.16，其揭露以引用方式併入本文中。在一實施態樣中，基因修飾 TIL 族群之方法包括轉位子媒介基因轉移的步驟。轉位子媒介基因轉移系統係所屬技術領域中已知且包括其中提供轉位酶作為 DNA 表現載體或作為可表現的 RNA 或蛋白質，使得轉位酶的長期表現不發生在基因轉殖細胞之系統，例如提供轉位酶作為 mRNA (例如包含罩蓋及聚腺苷酸尾之 mRNA)。合適轉位子媒介基因轉移系統包括鮭型 Tel 樣轉位酶 (SB 或睡美人轉位酶) 諸如 SB10、SB11 及 SB100x 及具有增加酶活性之經工程改造之酶係描述於例如 Hackett, et al., *Mol. Therapy* 2010, 18, 674-83 及美國專利第 6,489,458 號，彼等各者之揭露以引用方式併入本文中。

【0394】在一實施態樣中，用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d) 添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 對該第二TIL族群執行無菌電穿孔步驟或SQZ微流體膜破壞步驟，其中該無菌電穿孔步驟或SQZ微流體膜破壞步驟媒介至少一種短干擾RNA或一種傳訊RNA之轉移；

(f) 使該第二TIL族群靜置約1天；

(g) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(f)轉變至步驟(g)無需打開該系統而發生；

(h) 收集獲自步驟(g)的該治療性TIL族群以提供經收

集的TIL族群，其中自步驟(g)轉變至步驟(h)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(i) 將得自步驟(e)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(e)轉移至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(j) 使用基於二甲亞碲之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群，

其中該電穿孔步驟包含遞送用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的分子表現之短干擾RNA，且進一步其中選自由CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合所組成之群組的黏著性分子係藉由 γ 逆轉錄病毒或慢病毒方法插入該第一TIL族群、第二TIL族群或經收集的TIL族群中。

【0395】在一些實施態樣中，暫時性改變蛋白質表現係指由自我遞送RNA干擾(sd-RNA)所誘導之表現減少，該自我遞送RNA干擾係化學合成的具有高百分比2'-OH取代(一般為氟或-OCH₃)之不對稱siRNA雙股，其包含20個核苷酸反義(引導)股及13至15個鹼基同義(乘客)股且使用四乙二醇(TEG)連接子以其3'端接合至膽固醇。使用sd-RNA之方法已描述於Khvorova and Watts, Nat. Biotechnol. 2017, 35, 238-248；Byrne, et al., J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2013, 29, 855-864；及Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018,(印製中)，其揭露以引用方式併入本文中。在一實施態樣

中，遞送 sd-RNA 至 TIL 族群不需使用電穿孔、SQZ 或其他方法完成，而是使用 1 至 3 天期間使 TIL 族群暴露至濃度為 1 μM /10,000 個 TIL 於介質中之 sd-RNA。在一實施態樣中，遞送 sd-RNA 至 TIL 族群使用 1 至 3 天期間使 TIL 族群暴露至濃度為 10 μM /10,000 個 TIL 於介質中之 sd-RNA 完成。在一實施態樣中，遞送 sd-RNA 至 TIL 族群使用 1 至 3 天期間使 TIL 族群暴露至濃度為 50 μM /10,000 個 TIL 於介質中之 sd-RNA 完成。在一實施態樣中，遞送 sd-RNA 至 TIL 族群使用 1 至 3 天期間使 TIL 族群暴露至濃度為介於 0.1 μM /10,000 個 TIL 與 50 μM /10,000 個 TIL 於介質中之間之 sd-RNA 完成。在一實施態樣中，遞送 sd-RNA 至 TIL 族群使用 1 至 3 天期間使 TIL 族群暴露至濃度為介於 0.1 μM /10,000 個 TIL 與 50 μM /10,000 個 TIL 於介質中之間之 sd-RNA 完成，其中暴露至 sd-RNA 藉由添加新鮮 sd-RNA 至介質來執行二、三、四或五次。其他合適過程係描述於例如美國專利申請公開案第 US 2011/0039914 A1、US 2013/0131141 A1 及 US 2013/0131142 A1 號及美國專利第 9,080,171 號，彼等之揭露以引用方式併入本文中。

【0396】 在一些實施態樣中，使用根據圖 32 之過程在製造期間將 sd-RNA 插入 TIL 族群中。在一些實施態樣中，sd-RNA 編碼干擾 NOTCH 1/2 ICD、NOTCH 配體 mDLL1、PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGF β 、TGFBR2、cAMP 蛋白質激酶 A (PKA)、BAFF、BR3、CISH 及 / 或 CBLB 之 RNA。在一些實施態樣中，表現減少係基於基因靜默的

百分比判定，例如藉由流動式細胞測量術及 / 或 qPCR 評估。在一些實施態樣中，表現減少約 5%、約 10%、約 10%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90% 或約 95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90% 或約 95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約 75%、約 80%、約 85%、約 90% 或約 95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約 80%、約 85%、約 90% 或約 95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約 85%、約 90% 或約 95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約 80%。在一些實施態樣中，表現減少至少約 85%。在一些實施態樣中，表現減少至少約 90%。在一些實施態樣中，表現減少至少約 95%。在一些實施態樣中，表現減少至少約 99%。

【0397】 在一實施態樣中，用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含 IL-2 及視需要包含 4-1BB 促效抗體之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群約 2 至 5 天來執行第一擴增；

(d) 添加 OKT-3 以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中

該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、一或多種自我遞送RNA (sd-RNA)、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(f)轉變至步驟(g)無需打開該系統而發生；

(h) 收集獲自步驟(g)的該治療性TIL族群以提供經收集的TIL族群，其中自步驟(g)轉變至步驟(h)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(i) 將得自步驟(e)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(e)轉移至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(j) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群，

其中該一或多種sd-RNA暫時性抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的分子之表現。

【0398】 在一實施態樣中，用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含 IL-2 及視需要包含 4-1BB 促效抗體之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群約 2 至 5 天來執行第一擴增；

(d) 添加 OKT-3 以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約 1 至 3 天以獲得該第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、一或多種自我遞送 RNA (sd-RNA)、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (f) 轉變至步驟 (g) 無需打開該系統而發生；

(h) 收集獲自步驟 (g) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (g) 轉變至步驟 (h) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(i) 將得自步驟 (e) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (e) 轉移至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(j) 使用基於二甲亞碲之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群，

其中該一或多種sd-RNA暫時性抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的分子之表現，且進一步其中選自由CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合所組成之群組的黏著性分子係藉由 γ 逆轉錄病毒或慢病毒方法插入該第一TIL族群、第二TIL族群或經收集的TIL族群中。

A.sd-RNA方法

【0399】 基於化學修飾siRNA之可自我遞送RNAi技術可為本發明之方法所採用，以成功遞送sd-RNA至如本文所述之TIL。不對稱siRNA結構對主鏈的修飾與疏水性配體之組合(見例如Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018及美國專利公開號20160304873以及本文中之圖36及37)允許sd-RNA藉由簡單添加至培養基而穿透培養的哺乳動物細胞，不需要額外調配物及方法，充分利用sd-RNA的核酸酶穩定性。此穩定性允許在只需維持sd-RNA於介質中的有效濃度下，支持RNAi媒介之目標基因活性減少的恆定水準。雖然不受理論限制，sd-RNA的主鏈穩定化提供延長減少基因表現效應，其在非分裂細胞中可持續數月。

【0400】 在一實施態樣中，在本文中使用以靶向在本文中揭示之基因的sd-RNA具有圖36或圖37所示之結構。

【0401】在一些實施態樣中，超過95%的TIL轉染效率及目標的表現減少藉由各種特異性sd-RNA發生。在一些實施態樣中，含有數個未經修飾的核糖殘基之sd-RNA係經完全修飾的序列置換，以增加RNAi效應的效力及/或壽命。在一些實施態樣中，表現減少效應係維持12小時、24小時、36小時、48小時、5天、6天、7天或8天或更多天。在一些實施態樣中，表現減少效應在TIL經sd-RNA處理後10天或更多天降低。在一些實施態樣中，目標表現維持超過70%的表現減少。在一些實施態樣中，TIL中的目標表現維持超過70%的表現減少。在一些實施態樣中，PD-1/PD-L1途徑的表現減少允許TIL展現更強效的體內效應，這在一些實施態樣中是因為避免PD-1/PD-L1途徑的抑制效應。在一些實施態樣中，因sd-RNA之PD-1表現減少導致增加TIL增生。

1.sd-RNA選擇及特徵

a.sd-RNA寡核苷酸結構

【0402】小干擾RNA (siRNA)(有時稱為短干擾RNA或靜默RNA)是一種雙股RNA分子，長度通常為19至25個鹼基對。siRNA用於RNA干擾(RNAi)，其中其利用互補核苷酸序列干擾特定基因的表現。

【0403】雙股DNA (dsRNA)通常可用於定義包含一對RNA互補股(通常為同義(乘客)及反義(引導)股)之任何分子且可包括單股懸端區。相對於siRNA，用語dsRNA通常係

指包括 siRNA 分子序列的前驅物分子，該 siRNA 分子係藉由切割酶系統包括 Dicer 酶的作用從較大 dsRNA 分子釋放。

【0404】sd-RNA(可自我遞送 RNA)是一種新類型的經共價修飾的 RNAi 化合物，其不需要遞送媒劑即可進入細胞且相較於傳統 siRNA 具有改良的藥理學。「可自我遞送 RNA」或「sd-RNA」是經疏水性修飾的 RNA 干擾-反義雜交物，經證實在體外初代細胞及體內局部投予時高度有效。已證實強健攝取及/或靜默且無毒性。sd-RNA 是大致上不對稱的經化學修飾的核酸分子，具有極少雙股區域。sd-RNA 分子一般含有單股區域及雙股區域，且在分子的單股及雙股區域內皆可含有多種化學修飾。此外，sd-RNA 分子可附接至疏水性接合物，諸如本文所述之習知及先進的固醇類分子。sd-RNA(及/或能夠以與 sd-RNA 類似之方式採用之 RNA)及用於製造該 sd-RNA 之相關方法亦已廣泛描述於例如，美國專利公開號 US 2016/0304873、國際專利申請案公開號 WO2010/033246、國際專利申請案公開號 WO2017/070151、國際專利申請案公開號 WO2009/102427、國際專利申請案公開號 WO2011/1119887、國際專利申請案公開號 WO2010/033247、國際專利申請案公開號 WO2009045457、國際專利申請案公開號 WO2011/119852、國際專利申請案公開號 WO2011/119871、美國專利公開號 US 2011/0263680、國際專利申請案公開號 WO2010/033248、國際專利申請案公開號 WO2010/078536、國際專利申請案公開號 WO2010/090762、美國專利公開

號 US 20110039914、國際專利公開號 WO2011/109698、國際專利申請案公開號 WO2010/090762、美國專利第 US 8,815,818號、國際專利申請案公開號 WO2016/094845、國際專利申請案公開號 WO2017/193053、美國專利公開號 US 2006/0276635、國際專利申請案公開號 WO2001/009312、美國專利公開號 US 2017/0043024、美國專利公開號 US 2017/0312367、美國專利公開號 US 2016/0319278、美國專利公開號 US 2017/0369882、美國專利第 US 8,501,706號、美國專利公開號 US 2004/0224405、美國專利第 US 8,252,755號、美國專利公開號 US 2007/0031844、美國專利公開號 US 2007/0039072、美國專利公開號 US 2007/0207974、美國專利公開號 US 2007/0213520、美國專利公開號 US 2007/0213521、美國專利公開號 US 2007/0219362、美國專利公開號 US 2007/0238868、美國專利公開號 US 2014/0148362、美國專利公開號 US 2016/0193242、美國專利公開號 US 2016/01946461、美國專利公開號 US 2016/0201058、美國專利公開號 US 2016/0201065、美國專利公開號 US 2017/0349904、美國專利公開號 US 2018/0119144、美國專利第 US 7,834,170號、美國專利第 US 8,090,542號及美國專利公開號 US 2012/0052487，所有全文皆以引用方式併入本文中以符合所有目的；sd-RNA亦可購自 Advirna LLC, Worcester, MA, USA。為了最佳化sd-RNA結構、化學、靶向位置、序列優先性等，開發了專用演算法且運用於sd-RNA的效力預測（見例如，US

20160304873)。基於這些分析，功能性 sd-RNA 序列通常被定義為在 1 μ M 濃度下具有超過 70% 的表現減少，且機率超過 40%。

b. sd-RNA 寡核苷酸結構

【0405】在一些實施態樣中，用於本發明之一或多種 sd-RNA 可自線性雙股 DNA 模板產生。在一些實施態樣中，用於產生一或多種 sd-RNA 之線性雙股 DNA 模板係如美國專利第 US 8,859,229 號所述以及如下所述者。

【0406】在一些實施態樣中，藉由聚合酶鏈反應 (PCR) 所獲得且適用於體外 (*in vitro*) 轉錄 mRNA 之線性雙股 DNA 模板自 5' 至 3' 包含：在該雙股 DNA 之編碼股上之 RNA 聚合酶啟動子；長度小於 3,000 個核苷酸且在轉染至真核細胞後用於將 mRNA 有效轉譯成可偵測多肽之 5' 非轉譯區；編碼該多肽之開放閱讀框，其中該多肽對於待轉染之細胞是異源性的且其中該多肽係選自由免疫細胞之配體或受體、刺激或抑制免疫系統功能之多肽及抑制致癌多肽之功能的多肽所組成之群組；在轉染至真核細胞後用於將 mRNA 有效轉譯成可偵測多肽之 3' 非轉譯區；及在該雙股 DNA 之編碼股上之 50 至 5,000 個核苷酸的聚 (A) 延伸，其中該啟動子對於該開放閱讀框是異源性的，且其中該 DNA 模板並不包含在 DNA 載體內且終止於該聚 (A) 延伸的 3' 端。在一些實施態樣中，RNA 聚合酶啟動子包含選自由 T7、T3 或 SP6 RNA 聚合酶所組成之群組的 RNA 聚合酶之一致結合序列。

在一些實施態樣中，開放閱讀框編碼融合多肽。在一些實施態樣中，開放閱讀框編碼選自由PD-1、TGFBR2、CBLB (CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受體)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGF β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、cAMP蛋白質激酶A (PKA)及其組合所組成之群組的多肽。在一些實施態樣中，開放閱讀框編碼選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的多肽。在一些實施態樣中，線性雙股進一步包含內部核糖體進入位點。在一些實施態樣中，聚(A)延伸係300至400個核苷酸長。

【0407】 在一些實施態樣中，如請求項1之線性雙股DNA模板，其中該模板自5'至3'係由下列組成：在該雙股DNA之編碼股上之RNA聚合酶啟動子；長度小於3,000個核苷酸且在轉染至真核細胞後用於將mRNA有效轉譯成可偵測多肽之5'非轉譯區；編碼該多肽之開放閱讀框，其中該多肽對於待轉染之細胞是異源性的且其中該多肽係選自由免疫細胞之配體或受體、刺激或抑制免疫系統功能之多肽及抑制致癌多肽之功能的多肽所組成之群組；在轉染至真核細胞後用於將mRNA有效轉譯成可偵測多肽之3'非轉譯區；及在該雙股DNA之編碼股上之50至5,000個核苷酸

的聚(A)延伸，其中該啟動子對於該開放閱讀框是異源性的，且其中該DNA模板並不包含在DNA載體內且終止於該聚(A)延伸的3'端。在一些實施態樣中，該3'非轉譯區係至少100個核苷酸長。

【0408】 在一些實施態樣中，本發明提供產生上述線性雙股DNA模板之方法，其中方法包含產生前置及反置引子，其中前置引子包含實質上與受到關注之目標雙股DNA非編碼股互補之複數個核苷酸及作用為RNA聚合酶結合部位之複數個核苷酸，其中反置引子包含實質上與受到關注之目標雙股DNA編碼股互補之複數個核苷酸及複數個去氧胸苷核苷酸，及使用前置及反置引子執行聚合酶鏈反應擴增目標DNA以形成線性雙股DNA模板。在一些實施態樣中，本發明提供產生上述線性雙股DNA模板之方法，其中方法包含產生前置及反置引子，其中前置引子包含實質上與受到關注之目標雙股DNA直接上游的核苷酸區域互補之複數個核苷酸，其中反置引子包含實質上與受到關注之目標雙股DNA直接下游的核苷酸區域互補之複數個核苷酸及複數個去氧胸苷核苷酸，及使用前置及反置引子執行聚合酶鏈反應擴增目標DNA以形成線性雙股DNA模板。在一些實施態樣中，引子包含實質上與受到關注之雙股DNA的5'及3'非轉譯區中之核苷酸延伸互補的核苷酸序列。在一些實施態樣中，引子包含實質上與受到關注之雙股DNA的開放閱讀框內之核苷酸延伸互補的核苷酸序列。在一些實施態樣中，引子包含實質上與受到關注之雙股DNA的開放閱

讀框內之核苷酸延伸互補的核苷酸序列，其中引子進一步包含其中包含5'及3'非轉譯區之核苷酸延伸，其中前置引子中包含5'非轉譯區之核苷酸延伸係介於包含RNA聚合酶啟動子之核苷酸與實質上與受到關注之目標雙股DNA非編碼股互補之核苷酸之間，且其中反置引子中包含3'非轉譯區之核苷酸延伸係介於複數個去氧胸苷核苷酸與實質上與受到關注之目標雙股DNA編碼股互補之核苷酸之間。在一些實施態樣中，前置引子及開放閱讀框包含一致Kozak序列。

【0409】 在一些實施態樣中，本發明提供一種產生一或多種用於轉染細胞之RNA的方法，該方法包含自線性雙股DNA模板執行體外轉錄。在一些實施態樣中，方法進一步包含使用聚(A)聚合酶以一或多個腺嘌呤核苷酸或其類似物延長RNA之聚(A)尾。在一些實施態樣中，方法進一步包含在轉錄期間添加作用為轉錄RNA之5'罩蓋的核苷酸。在一些實施態樣中，RNA靶向選自由PD-1、TGFBR2、CBLB(CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受體)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGF β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、cAMP蛋白質激酶A (PKA)及其組合所組成之群組的多肽。在一些實施態樣中，RNA靶向選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、

CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的多肽。

【0410】 在一些實施態樣中，本發明採用一或多種自線性雙股DNA模板產生之單離RNA之用途，該單離RNA包含一或多個開放閱讀框。在一些實施態樣中，本發明提供一種用於在細胞中表現一或多種RNA之方法，該方法包含使細胞與一或多種自線性雙股DNA模板生產之RNA接觸。在一些實施態樣中，RNA係以不等莫耳量存在，以提供分開的細胞中RNA表現水準。在一些實施態樣中，一或多種RNA靶向選自由PD-1、TGFBR2、CBLB (CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受體)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGF β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、cAMP蛋白質激酶A (PKA)及其組合所組成之群組的多肽。在一些實施態樣中，一或多種RNA靶向選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的多肽。

(i)非轉譯區

【0411】 亦可使用有能力促進穩定性及/或轉譯效率之化學結構。RNA較佳地具有5'及3' UTR。以下實例證

實，在PCR模板中納入44個5' UTR鹼基對相較於含有僅6個5' UTR鹼基對之PCR模板使得轉錄的CFP RNA具有較高轉譯效率。實例亦證實，添加113個3' UTR鹼基對相較於含有僅11個3' UTR鹼基對之PCR模板使得轉錄的GFP RNA具有較高轉譯效率。一般來說，3' UTR的長度超過100個核苷酸，且因此長於100個核苷酸之3' UTR係較佳。在一實施態樣中，3' UTR序列係介於100與5000個核苷酸之間。5' UTR的長度不像3' UTR的長度那麼關鍵且可以較短。在一實施態樣中，5' UTR的長度係介於零與3000個核苷酸之間。欲添加至編碼區的5'及3' UTR序列的長度可藉由不同方法改變，包括但不限於設計用於PCR之與UTR之不同區域黏合的引子。使用此方式，所屬技術領域中具有通常知識者可修飾在轉染轉錄的RNA後欲達成最佳轉譯效率所需的5'及3' UTR長度。

【0412】 5'及3' UTR可為受到關注之基因的天然發生、內源性5'及3' UTR。替代地，受到關注之基因的非內源性UTR序列可藉由將UTR序列併入前置及反置引子或藉由對模板進行任何其他修飾來添加。受到關注之基因的非內源性UTR序列之用途可有用地用於修飾RNA的穩定性及/或轉譯效率。例如，已知3' UTR序列中富含AU之元件可降低mRNA的穩定性。因此，可選擇或設計3' UTR，以基於所屬技術領域中廣知的UTR之性質來增加轉錄的RNA之穩定性。

【0413】 在一實施態樣中，5' UTR可含有內源性基因

的 Kozak 序列。替代地，當受到關注之基因的非內源性 5' UTR 如上述藉由 PCR 添加時，可藉由添加 5' UTR 序列重新設計一致 Kozak 序列。Kozak 序列可增加一些 RNA 轉錄物的轉譯效率，但似乎不是使所有 RNA 能夠有效轉譯所需。許多 mRNA 需要 Kozak 序列係所屬技術領域中已知。在其他實施例中，5' UTR 可衍生自 RNA 病毒，其 RNA 基因體在細胞中穩定。在其他實施例中，各種核苷酸類似物可用於 3' 或 5' UTR 中以妨礙核酸外切酶降解 mRNA。

(ii) RNA 聚合酶啟動子

【0414】為了能夠在無需基因選殖下自 DNA 模板合成 RNA，應將轉錄啟動子附接至 DNA 模板欲轉錄序列上游。噬菌體 RNA 聚合酶啟動子序列可藉由不同基因工程改造方法諸如 DNA 接合附接至 St UTR，或可被添加至實質上與目標 DNA 互補之序列的前置引子 (5')。當作用為 RNA 聚合酶啟動子之序列被添加至前置引子的 5' 端時，RNA 聚合酶啟動子變成併入待轉錄開放閱讀框上游之 PCR 產物中。在一較佳實施態樣中，啟動子係如上述之 T7 聚合酶啟動子。其他有用的啟動子包括但不限於 T3 及 SP6 RNA 聚合酶啟動子。T7、T3 及 SP6 啟動子之一致核苷酸序列係所屬技術領域中已知。

(iii) 聚 (A) 尾及 5' 罩蓋

【0415】在一較佳實施態樣中，mRNA 具有在 5' 端的

罩蓋及3'聚(A)尾，兩者決定在細胞中的核糖體結合、轉譯起始及mRNA穩定性。在環狀DNA模板例如質體DNA上，RNA聚合酶產生長多聯體(concatameric)產物，其不適合在真核細胞中表現。在3' UTR端經線性化的質體DNA的轉錄導致正常大小的mRNA，其即使在轉錄後經聚腺苷酸化，仍無法進行有效真核轉染。

【0416】在線性DNA模板上，噬菌體T7 RNA聚合酶可將轉錄物的3'端延長超過模板的最後一個鹼基(Schenborn and Mierendorf, *Nuc. Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003)。此可導致跑出(runoff)轉錄物彎折，隨後模板與第二DNA股或RNA本身的轉錄物交換(Triana-Alonso et al., *J. Biol. Chem.*, 270:6298-307 (1995); Dunn and Studier, *J. Mol. Biol.*, 166:477-535 (1983); Arnaud-Barbe et al., *Nuc. Acids Res.*, 26:3550-54 (1998); Macdonald et al., 1993)，且接著導致反方向異常轉錄及雙股RNA累積，其可抑制基因表現。DNA線性化本身不足以正確轉錄(Triana-Alonso et al., *J. Biol. Chem.*, 270:6298-307 (1995); Dunn and Studier, *J. Mol. Biol.*, 166:477-535 (1983); Arnaud-Barbe et al., 1998 *Nuc. Acids Res.*, 26:3550-54 (1998); Macdonald et al., *J. Mol. Biol.*, 232:1030-47 (1993); Nakano et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 64:194-99 (1999)，在64至100個核苷酸的聚(A/T)延伸下游線性化的質體DNA導致良好模板(Saebøe-Larsen et al., *J. Immunol.*

Meth., 259:191-203 (2002); Boczkowski et al., Cancer Res., 60:1028-34 (2000); Elango et al., Biochem Biophys Res Commun., 330:958-966 (2005)。T7 RNA聚合酶的內源性終止信號編碼可折疊成莖環結構後接一條尿苷殘基鏈(a track of uridine residues)之RNA(Dunn and Studier, J. Mol. Biol., 166:477-535 (1983); Arnaud-Barbe et al., 1998 Nuc. Acids Res., 26:3550-54 (1998))。即使沒有髮夾結構(hairpin)，一條合成的尿苷鏈可減弱轉錄(Kiyama and Oishi, Nuc. Acids Res., 24:4577-4583 (1996))。假設在聚(A/T)延伸下游的質體DNA線性化可能形成一種預防潛在異常轉錄的「動態」終止子：RNA轉錄物的3'延長超過聚(A/T)延伸及反方向轉錄將產生類生長終止信號，即延長的聚(U)延伸及聚(A/U)髮夾。因此，逆轉錄PCR引子設計為GFP基因下游的3'錨定序列及5' 100個鹼基延伸的聚(T)(圖38)。

【0417】整合聚A/T延伸至DNA模板中的習知方法係分子選殖。然而，整合至質體DNA中之聚A/T序列可造成質體的不穩定，這也就是為什麼獲自細菌細胞的質體DNA模板通常具有刪除及其他異常的高度污染。這使得選殖程序不僅耗費人力及時間，通常也不可靠。這也就是為什麼允許不需選殖而建構具有聚A/T 3'延伸之DNA模板係高度所欲。

【0418】轉錄性DNA模板的聚A/T區段可在PCR期間使用含有聚T尾諸如100T尾(大小可為50至5000個T)之反置引子產生或在PCR之後藉由任何其他方法產生，包括但不

限於DNA接合或體外重組。聚(A)尾亦提供RNA穩定性且減少其降解。大致上，聚(A)尾的長度與轉錄的RNA之穩定性有正向相關。在一實施態樣中，聚(A)尾係介於100與5000個腺苷之間。以下實例證實，100個鹼基對延伸的聚(A)足以使RNA轉錄物能夠有效轉譯。

【0419】RNA的聚(A)尾在體外轉錄後可進一步使用聚腺苷酸聚合酶延長，諸如大腸桿菌(*E. coli*)聚A聚合酶(E-PAP)。以下實例證實，將聚(A)尾的長度從100個核苷酸增加至介於300與400個核苷酸之間導致RNA轉譯效率約增加二倍。此外，附接不同化學基團至3'端可增加mRNA穩定性。該附接可含有經修飾/人工核苷酸、適體及其他化合物。例如，可使用聚腺苷酸聚合酶將ATP類似物併入聚(A)尾中。ATP類似物可進一步增加RNA的穩定性。合適的ATP類似物包括但不限於心磷脂(cordicicpin)及8-氫雜腺苷。

【0420】5'罩蓋亦可提供穩定性給RNA分子。在一較佳實施態樣中，藉由在本文中揭示之方法所產生的RNA包括5'罩蓋。5'罩蓋可為例如 $m^7G(5')ppp(5')G$ 、 $m^7G(5')ppp(5')A$ 、 $G(5')ppp(5')G$ 或 $G(5')ppp(5')A$ 罩蓋類似物，所有皆可購自商業途徑。5'罩蓋亦可為抗反向罩蓋類似物(ARCA)(見Stepinski, et al., *RNA*, 7:1468-95 (2001))或任何其他合適類似物。5'罩蓋係使用所屬技術領域中已知及本文所述之技術提供(Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7:1468-95 (2001); Elango, et

al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330:958-966 (2005))。

【0421】藉由在本文中揭示之方法產生之RNA亦可含有內部核糖體進入位點(IRES)序列。IRES序列可為任何病毒、染色體或人工設計序列，其起始罩蓋非依賴性核糖體與mRNA之結合且促進轉譯之起始。可包括任何適用於細胞電穿孔之溶質，其可含有促進細胞性穿透性及存活性之因子，諸如糖、肽、脂質、蛋白質、抗氧化劑及界面活性劑。

【0422】在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現99%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 至約10 μM (在一些實施態樣中約0.25 μM 至約4 μM)的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現

減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的

濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM /10,000 個 TIL 或約 0.25 μM 至約 4 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在

一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在

一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM /10,000 個 TIL 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM /10,000 個 TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM /10,000 個 TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM /10,000 個 TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM /10,000 個 TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM /10,000 個 TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM /10,000 個 TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序

列當以約 1.75 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 $\mu\text{M}/10,000$ 個 TIL/ $100 \mu\text{L}$ 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之

sd-RNA序列當以約6.0 μM /10,000個TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約7.0 μM /10,000個TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約8.0 μM /10,000個TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約9.0 μM /10,000個TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約10.0 μM /10,000個TIL/100 μL 介質的濃度遞送時展現目標基因表現減少。

c.sd-RNA修飾

【0423】在一些實施態樣中，寡核苷酸劑包含一或多種修飾以增加治療劑的穩定性及/或有效性及致效寡核苷酸至所欲治療之細胞或組織的有效遞送。該等修飾可包括2'-O-甲基修飾、2'-O-氟基修飾、二硫代磷酸酯修飾、2'-F修飾的核苷酸、2'-O-甲基修飾的及/或2'去氧核苷酸。在一些實施態樣中，寡核苷酸係經修飾以包括一或多種疏水性修飾，包括例如固醇、膽固醇、維生素D、萘基、異丁基、苄基、吡啶、色胺酸及/或苯基。在額外特定實施態樣中，經化學修飾的核苷酸係硫代磷酸酯、2'-O-甲基、2'去氧、疏水性修飾及硫代磷酸酯之組合。在一些實施態樣中，糖可經修飾且經修飾的糖可包括但不限於D-核糖、

2'-O-烷基(包括2'-O-甲基及2'-O-乙基)，即2'-烷氧基、2'-胺基、2'-S-烷基、2'-鹵基(包括2'-氟基)、T-甲氧基乙氧基、2'-烯丙基氧基(-OCH₂CH=CH₂)、2'-丙炔基、2'-丙基、乙炔基、乙烯基、丙烯基及氰基及類似物。在一實施態樣中，糖部份可為己糖且如所述併入寡核苷酸中(Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res., 18:4711 (1992))。

【0424】 在一些實施態樣中，本發明之雙股寡核苷酸的全長係雙股，即分子任一端不具有懸端單股序列，即為鈍端。在一些實施態樣中，個別核酸分子可具有不同長度。換句話說，本發明之雙股寡核苷酸不是全長雙股。例如，當使用二個分開的核酸分子時，其中一個分子例如包含反義序列的第一分子可比與其雜交之第二分子更長(留下一部分的分子為單股)。在一些實施態樣中，當使用單一核酸分子時，一部分的分子在任一端可維持單股。

【0425】 在一些實施態樣中，本發明之雙股寡核苷酸含有錯配及/或環或凸起，但在寡核苷酸至少約70%的長度中為雙股。在一些實施態樣中，本發明之雙股寡核苷酸在寡核苷酸至少約80%的長度中為雙股。在另一實施態樣中，本發明之雙股寡核苷酸在寡核苷酸至少約90%至95%的長度中為雙股。在一些實施態樣中，本發明之雙股寡核苷酸在寡核苷酸至少約96%至98%的長度中為雙股。在一些實施態樣中，本發明之雙股寡核苷酸含有至少或至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個錯配。

【0426】 在一些實施態樣中，寡核苷酸可藉由修飾例如 3' 或 5' 鍵聯 (例如美國專利第 5,849,902 號及 WO 98/13526) 而實質上不受核酸酶作用。例如，可藉由納入「阻斷基團」而使寡核苷酸具有抗性。本文中使用的用語「阻斷基團」係指可附接至寡核苷酸或核單體 (nucleomonomer) 作為合成之保護基或偶合基團 (例如 FITC、丙基 (CH₂-CH₂-CH₃)、二醇 (-O-CH₂-CH₂-O-) 磷酸鹽 (PO₃²⁻)、氫膦酸鹽或胺基磷酸酯 (phosphoramidite)) 之取代基 (例如除 OH 基團以外)。「阻斷基團」亦可包括保護寡核苷酸的 5' 及 3' 末端的「末端阻斷基團」或「核酸外切酶阻斷基團」，其包括經修飾的核苷酸及非核苷酸核酸外切酶抗性結構。

【0427】 在一些實施態樣中，sd-RNA 內之至少一部分毗連多核苷酸係藉由取代基鍵聯例如硫代磷酸酯鍵聯連接。

【0428】 在一些實施態樣中，化學修飾可導致至少 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500 種細胞攝取增強 (enhancements in cellular uptake)。在一些實施態樣中，C 或 U 殘基中之至少一者包括疏水性修飾。在一些實施態樣中，複數個 C 及 U

含有疏水性修飾。在一些實施態樣中，至少10%、15%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%的C及U可含有疏水性修飾。在一些實施態樣中，所有C及U含有疏水性修飾。

【0429】在一些實施態樣中，sd-RNA或sd-rxRNA經由併入可質子化胺展現增強的胞內體釋放sd-rxRNA分子。在一些實施態樣中，可質子化胺被併入同義股(在RISC裝載後被棄置的分子部分)。在一些實施態樣中，本發明之sd-RNA化合物包含不對稱化合物，該不對稱化合物包含雙股區域(有效RISC進入所需，10至15個鹼基長)及4至12個核苷酸長的單股區域；具有13個核苷酸雙股。在一些實施態樣中，採用6個核苷酸的單股區域。在一些實施態樣中，sd-RNA之單股區域包含2至12個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯(稱為硫代磷酸酯修飾)。在一些實施態樣中，採用6至8個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯。在一些實施態樣中，本發明之sd-RNA化合物亦包括獨特的化學修飾模式，其提供穩定性且與RISC進入相容。

【0430】舉例來說，引導股亦可藉由任何證實穩定性且不干擾RISC進入的化學修飾來修飾。在一些實施態樣中，引導股中的化學修飾模式包括大部分C及U核苷酸是2'F修飾的，且5'端經磷酸化。

【0431】在一些實施態樣中，sd-RNA或sd-rxRNA中至少30%的核苷酸是經修飾的。在一些實施態樣中，sd-RNA或sd-rxRNA中至少30%、31%、32%、33%、34%、

35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的核苷酸是經修飾的。在一些實施態樣中，sd-RNA或sd-rxRNA中100%的核苷酸是經修飾的。

【0432】在一些實施態樣中，sd-RNA分子具有極少雙股區域。在一些實施態樣中，雙股的分子區域從8至15個核苷酸長不等。在一些實施態樣中，雙股的分子區域是8、9、10、11、12、13、14或15個核苷酸長。在一些實施態樣中，雙股區域是13個核苷酸長。引導與乘客股之間可有100%互補性，或者引導與乘客股之間可有一或多個錯配。在一些實施態樣中，在雙股分子的一端上，分子為鈍端或具有一個核苷酸懸端。分子的單股區域在一些實施態樣中是介於4至12個核苷酸長。在一些實施態樣中，單股區域可為4、5、6、7、8、9、10、11或12個核苷酸長。在一些實施態樣中，單股區域亦可少於4個或大於12個核苷酸長。在某些實施態樣中，單股區域是6或7個核苷酸長。

【0433】在一些實施態樣中，sd-RNA分子具有降低的穩定性。在一些例子中，經化學修飾的sd-RNA或sd-rxRNA分子在介質中具有長於1、2、3、4、5、6、7、8、

9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或超過24小時(包括任何中間值)的半衰期。在一些實施態樣中，sd-rxRNA在介質中具有長於12小時的半衰期。

【0434】在一些實施態樣中，sd-RNA係經最佳化以增加效力及/或減少毒性。在一些實施態樣中，引導及/或乘客股的核苷酸長度及/或引導及/或乘客股中的硫代磷酸酯修飾數量在一些態樣可影響RNA分子的效力，然而以2'-O-甲基(2'OMe)修飾置換2'-氟基(2'F)修飾在一些態樣中可影響分子的毒性。在一些實施態樣中，預期減少分子的2'F含量可減少分子的毒性。在一些實施態樣中，RNA分子中硫代磷酸酯修飾的數量可影響細胞的分子攝取，例如被動攝取分子至細胞中的效率。在一些實施態樣中，sd-RNA不具有2'F修飾，但仍以相等的細胞攝取性及組織穿透效率為表徵。

【0435】在一些實施態樣中，引導股的長度大約是18至19個核苷酸且具有大約2至14個磷酸鹽修飾。例如，引導股可含有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14個或超過14個經磷酸鹽修飾的核苷酸。引導股可含有一或多個授予增加的穩定性且不干擾RISC進入的修飾。經磷酸鹽修飾的核苷酸(諸如經硫代磷酸酯修飾的核苷酸)可位於3'端、5'端或分布在整個引導股。在一些實施態樣中，引導股3'末端之10個核苷酸含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個經硫代磷酸酯修飾的核苷酸。引導股亦可含有

2'F及/或2'OMe修飾，其可位於整個分子中。在一些實施態樣中，在引導股位置一之核苷酸(引導股最5'位置的核苷酸)是經2'OMe修飾的及/或經磷酸化的。引導股內的C及U核苷酸可經2'F修飾。例如，19個nt之引導股的位置2至10(或對應不同長度引導股中之位置)之C及U核苷酸可經2'F修飾。引導股內的C及U核苷酸亦可經2'OMe修飾。例如，19個nt之引導股的位置11至18(或對應不同長度引導股中之位置)之C及U核苷酸可經2'OMe修飾。在一些實施態樣中，在引導股最3'端的核苷酸未經修飾。在某些實施態樣中，在引導股內大部分C及U係經2'F修飾且引導股的5'端係經磷酸化。在其他實施態樣中，位置1及在位置11至18的C或U係經2'OMe修飾且引導股的5'端係經磷酸化。在其他實施態樣中，位置1及在位置11至18的C或U係經2'OMe修飾，引導股的5'端係經磷酸化且在位置2至10的C或U係經2'F修飾。

d. 遞送 sd-RNA

【0436】可自我遞送RNAi技術提供用RNAi劑直接轉染細胞之方法，無須額外調配物或技術。轉染難以轉染細胞系的能力、高體內活性及易於使用是這類組成物及方法的特徵，相較於基於siRNA之傳統技術呈現顯著功能優點，且因此在數個關於在本發明之TIL中目標基因表現減少的方法之實施態樣中採用sd-RNA方法。sd-RNAi方法允許直接遞送化學合成化合物至廣泛範圍的離體(ex-vivo)及

體內初代細胞及組織。在本發明的一些實施態樣中描述的 sd-RNA 可購自 Advirna LLC, Worcester, MA, USA。

【0437】sd-RNA 分子的一般結構係顯示於圖 36。sd-RNA 係形成為經疏水性修飾的 siRNA-反義寡核苷酸雜交結構，且揭示於例如 Byrne et al., December 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutics, 29(10): 855-864，其全文以引用方式併入本文中。

【0438】在一些實施態樣中，sd-RNA 寡核苷酸可使用無菌電穿孔遞送至本文所述之 TIL。

【0439】在一些實施態樣中，寡核苷酸可與跨膜遞送系統組合以遞送至細胞。在一些實施態樣中，此跨膜遞送系統包含脂質、病毒載體及類似物。在一些實施態樣中，寡核苷酸劑係自我遞送 RNAi 劑，不需要任何遞送劑。

【0440】在實施例中，寡核苷酸諸如本文所述之 RNA 或 sd-RNA 可使用不同方法導入目標細胞中，例如包括但不限於下列之市售方法：電穿孔 (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, MA)、Neon™ 轉染系統 (可購自 ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 及 / 或 Gene Pulser II (BioRad, Denver, CO)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)、使用脂質體轉染之陽離子脂質體媒介之轉染、聚合物包封、肽媒介之轉染或生物彈道粒子遞送系統諸如「基因槍」(見例如 Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12 (8):861-70 (2001)，其全文以引用方式併入本文中)。亦見美國專利第

8,859,229號、美國專利申請案號 2016/0230188 以及 Amaxa Nucleofector® II 使用手冊 (可得自全球資訊網 http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/R401-core/Nucleofector_Manual_II_Apr06.pdf)。

【0441】在一些實施態樣中，可根據廠商建議使用 Amaxa NUCLEOFECTOR.TM.-II 執行電穿孔。在一些實施態樣中，TIL 可使用 NUCLEOFECTOR.TM.-II 溶液 V 及建議電穿孔方案組轉染。在一些實施態樣中，TIL 可使用溶液 V、T 及 R 及不同電穿孔方案轉染。在一些實施態樣中，TIL 可使用 T 細胞 NUCLEOFECTOR.TM.-II 溶液及不同電穿孔方案轉染。亦可採用核酸遞送之替代方法以轉染本文所述之寡核苷酸：使用 LIPOFECTIN 或 LIPOFECTAMIN (Invitrogen) 執行陽離子脂質體媒介之轉染。電穿孔亦使用 ECM 830 (BTX)(Harvard Instruments, Boston, MA)、Gene Pulser II (BioRad, Denver, CO)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany) 及 / 或 Neon™ 轉染系統 (可購自 ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 執行。在一些實施態樣中，可採用 pmaxGFP 質體 DNA (Amaxa Biosystems) 作為 DNA 對照。在一些實施態樣中，轉染效率 (ET) 可在轉染後大約 3、6、9、12、15 及 / 或 18 小時藉由螢光激活細胞分選 (FACS) 判定。在一些實驗中，可進一步每 12 小時至 24 小時分析一次轉染細胞直到 GFP 對照組無法偵測到 GFP 為止。在一些實施態樣中，細胞存活性可藉由台盼藍染料排除判定。

【0442】寡核苷酸及寡核苷酸組成物接觸 (例如，使

接觸，在本文中亦稱為投予或遞送至)本文所述之TIL且被攝入，包括經由TIL被動攝取。sd-RNA可在第一擴增期間(例如，步驟B)、在第一擴增之後(例如，步驟C期間)、第二擴增之前或期間(例如，步驟D之前或期間)、步驟D之後及步驟E收集之前、步驟F收集期間或之後、步驟F最終調配物及/或轉移至輸注袋之前或期間、以及步驟F任何可選的冷凍保存步驟之前添加至本文所述之TIL。另外，sd-RNA可在從步驟F任何冷凍保存步驟解凍後添加。在一實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA，以選自由100 nM至20 mM、200 nM至10 mM、500 nM至1 mM、1 μ M至100 μ M及1 μ M至100 μ M所組成之群組的濃度添加至包含TIL及其他劑之細胞培養基。在一實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA，以選自由0.1 μ M sd-RNA/10,000個TIL/100 μ L介質、0.5 μ M sd-RNA/10,000個TIL/100 μ L介質、0.75 μ M sd-RNA/10,000個TIL/100 μ L介質、1 μ M sd-RNA/10,000個TIL/100 μ L介質、1.25 μ M sd-RNA/10,000個TIL/100 μ L介質、1.5 μ M sd-RNA/10,000個TIL/100 μ L介質、2 μ M sd-RNA/10,000個TIL/100 μ L介質、5 μ M sd-RNA/10,000個TIL/100 μ L介質或10 μ M sd-RNA/10,000個TIL/100 μ L介質所組成之群組的量添加至包含TIL及其他劑之細胞培養基。在一實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-

3、CISH及CBLB之sd-RNA在REP前或REP階段期間，以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至TIL培養。在一實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA，以選自由0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL、1 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、2 μM sd-RNA/10,000個TIL、5 μM sd-RNA/10,000個TIL或10 μM sd-RNA/10,000個TIL所組成之群組的量添加至包含TIL及其他劑之細胞培養基。在一實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA在第一、第二及額外擴增階段期間，以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至TIL培養。

【0443】本發明之寡核苷酸組成物包括sd-RNA可在擴增過程期間與本文所述之TIL接觸，例如以高濃度溶解sd-RNA於細胞培養基中且允許足夠時間讓被動攝取發生。在一些實施態樣中，高濃度包括0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL、1 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、2 μM sd-RNA/10,000個TIL、5 μM sd-RNA/10,000個TIL或10

μM sd-RNA/10,000個 TIL。在一些實施態樣中，高濃度包括 2 μM sd-RNA/10,000個 TIL、5 μM sd-RNA/10,000個 TIL 或 10 μM sd-RNA/10,000個 TIL。在一些實施態樣中，高濃度包括 5 μM sd-RNA/10,000個 TIL 或至多 10 μM sd-RNA/10,000個 TIL。

【0444】在一些實施態樣中，遞送寡核苷酸至細胞中可藉由合適的本領域認可方法增強，包括磷酸鈣、DMSO、甘油或葡聚糖、電穿孔，或藉由使用例如陽離子、陰離子或中性脂質組成物或脂質體使用所屬技術領域中已知之方法轉染(見例如 WO 90/14074；WO 91/16024；WO 91/17424；美國專利第4,897,355號；Bergan et a 1993. *Nucleic Acids Research*. 21 :3567)。

e.sd-RNA組合

【0445】在一些實施態樣中，使用超過一個 sd-RNA 來減少目標基因的表現。在一些實施態樣中，一起使用一或多種靶向 PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3 及 / 或 CISH 之 sd-RNA。在一些實施態樣中，使用 PD-1 sd-RNA 與 TIM-3、CBLB、LAG3 及 / 或 CISH 中之一或多者，以減少超過一個基因目標的表現。在一些實施態樣中，使用 LAG3 sd-RNA 與靶向 CISH 之 sd-RNA 的組合，以減少兩個目標的基因表現。在一些實施態樣中，在本文中靶向 PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3 及 / 或 CISH 中之一或多者之 sd-RNA 可購自 Advirna LLC, Worcester, MA, USA。在一些實施態樣中，

靶向PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3及/或CISH中之一或多者之sd-RNA具有圖36或圖37所示之結構。

【0446】 在一些實施態樣中，sd-RNA靶向選自由PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的基因。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向選自由PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的基因。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向PD-1且另一個sd-RNA靶向選自由LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)及其組合所組成之群組的基因。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向選自PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3及其組合的基因。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向選自PD-1及LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其組合中之一者的基因。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向PD-1且一個sd-RNA靶向LAG3。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向PD-1且一個sd-RNA靶向CISH。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向PD-1且一個sd-RNA靶向CBLB。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向LAG3且一個sd-RNA靶向CISH。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向LAG3且一個sd-RNA靶向CBLB。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向CISH且一個sd-RNA靶向CBLB。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向TIM3且一個sd-RNA靶向PD-1。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向TIM3且一個sd-RNA

靶向LAG3。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向TIM3且一個sd-RNA靶向CISH。在一些實施態樣中，一個sd-RNA靶向TIM3且一個sd-RNA靶向CBLB。

f.過度表現共刺激受體或黏著性分子

【0447】根據額外實施態樣，在TIL擴增方法期間改變TIL的蛋白質表現亦可允許在至少一部分的治療性TIL族群中增強一或多個免疫檢查點基因的表現。例如，改變蛋白質表現可造成刺激受體的表現受到增強，這表示相較於未經基因修飾的刺激受體的表現，其係過度表現。可藉由暫時性改變本發明之TIL的蛋白質表現來展現增強表現之免疫檢查點基因的非限制性實例包括某些趨化激素受體及介白素，諸如CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2細胞內結構域(ICD)及/或NOTCH配體mDLL1。

(i)CCR及CCL

【0448】為了使過繼性T細胞免疫療法有效，必須藉由趨化激素使T細胞適當移動至腫瘤中。由腫瘤細胞分泌之趨化激素、存在於周邊的趨化激素與T細胞所表現的趨化激素受體之間的匹配對於使T細胞成功移動至腫瘤床中來說是重要的。

【0449】根據具體實施態樣，本發明之改變蛋白質表現方法可用於增加TIL中某些趨化激素受體的表現，諸如

一或多種 CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3 及 / 或 CX3CR1。CCR 之過度表現可能有助於促進 TIL 在過繼性轉移後的效應功能及增生。在一些實施態樣中，本發明之改變蛋白質表現方法可用於增加 TIL 中 CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22 及 / 或 CCL17 的表現。

【0450】根據具體實施態樣，TIL 中一或多種 CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3 及 / 或 CX3CR1 的表現係根據本發明之組成物及方法增強。例如，用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法可根據本文所述之方法的任何實施態樣 (例如過程 2A 或圖 20 及 21 所示之方法) 進行，其中方法包含藉由增強一或多種 CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3 及 / 或 CX3CR1 的表現來基因編輯至少一部分的 TIL。如以下更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可編程的核酸酶在趨化激素受體基因處媒介產生雙股或單股斷裂。例如，CRISPR 方法、TALE 方法或鋅指方法可用於增強 TIL 中某些趨化激素受體的表現。

【0451】在一實施態樣中，CCR4 及 / 或 CCR5 黏著性分子係使用如本文所述之 γ 逆轉錄病毒或慢病毒方法插入 TIL 族群中。在一實施態樣中，CXCR2 黏著性分子係使用如 Forget, et al., *Frontiers Immunology* 2017, 8, 908 or Peng, et al., *Clin. Cancer Res.* 2010, 16, 5458 所述之 γ 逆轉錄病毒或慢病毒方法插入 TIL 族群中，其揭露以引用方式併入本文中。

【0452】 在一些實施態樣中，本發明提供一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法，其包含：

(i) 自患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(ii) 藉由在包含 IL-2 及視需要 OKT-3 之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群來執行第一擴增以產生第二 TIL 族群；

(iii) 藉由用額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 補充該第二 TIL 族群之細胞培養基來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群於數量上高於該第二 TIL 族群至少 100 倍，且其中該第二擴增執行至少 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群；及

(iv) 使該第二及/或第三 TIL 族群暴露至轉錄因子 (TF) 及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該 TF 及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性 TIL 族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性 T 細胞的數量，其中改變的表現係一或多種 CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1、CXCL8 及/或 CCL22 的表現增加。

(ii) 介白素及其他

【0453】 根據額外實施態樣，本發明之基因編輯方法可用於增加某些介白素的表現，諸如一或多種 IL-2、IL-

4、IL-7、IL-10、IL-15及IL-21，還有NOTCH 1/2細胞內結構域(ICD)。某些介白素已證實可放大T細胞的效應功能且媒介腫瘤控制。

【0454】根據具體實施態樣，TIL中之一或多種IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15及IL-21還有NOTCH 1/2細胞內結構域(ICD)的表現係根據本發明之組成物及方法而增強。在一些實施態樣中，本發明提供一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，該方法包含：

(i) 自患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(ii) 藉由在包含IL-2及視需要OKT-3之細胞培養基中培養該第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群；

(iii) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL族群之細胞培養基來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第三TIL族群於數量上高於該第二TIL族群至少100倍，且其中該第二擴增執行至少14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群；及

(iv) 使該第二及/或第三TIL族群暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性TIL族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞的數量，其中改變的表現係一或多種IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15及IL-21還有NOTCH 1/2細胞內結構域(ICD)的表現增加。

IV. TIL製造過程

【0455】含有一些這些特徵的例示性TIL過程(稱為過程2A)係描繪於圖1，且本發明之此實施態樣的一些優於過程1C的優點係描述於圖2以及圖13及14。過程1C係顯示於圖3以供比較。基於過程2A之二個用於TIL療法之替代性時間表係顯示於圖4(較高細胞計數)及圖5(較低細胞計數)。過程2A之實施態樣係顯示於圖6以及圖8。圖13及14進一步提供例示性2A過程與例示性1C過程之比較。

【0456】如本文中所討論，本發明可包括關於再刺激冷凍保存的TIL的步驟，以增加彼等的代謝活性及因此在移植至患者中之之前的相對健康，以及測試該代謝健康之方法。如在本文中大致概述，TIL通常取自患者樣本且經操作以在移植至患者中之前擴增彼等之數量。在一些實施態樣中，TIL視需要可經如下討論之基因操作。

【0457】在一些實施態樣中，TIL可經冷凍保存。一旦解凍後，彼等亦可經再刺激以在輸注至患者中之前增加彼等之代謝。

【0458】在一些實施態樣中，如以下及實例及圖式中所詳細討論的，第一擴增(包括稱為REP前之過程以及圖8步驟A所示之過程)縮短至3至14天且第二擴增(包括稱為REP之過程以及圖8步驟B所示之過程)縮短至7至14天。在一些實施態樣中，第一擴增(例如，圖8步驟B所述之擴增)縮短至11天且第二擴增(例如，圖8步驟D所述之擴增)縮短

至11天，如實例中所討論且顯示於圖4、5、6及7。在一些實施態樣中，如以下及實例及圖式中所詳細討論的，第一擴增與第二擴增(例如，如圖8步驟B及步驟D所描述之擴增)之組合縮短為22天。

【0459】以下的「步驟」代號A、B、C等參照圖8且參照本文所述之某些實施態樣。以下及圖8中的步驟順序為例示性且步驟的任何組合或順序以及額外步驟、重複步驟及/或步驟省略皆在本申請案及在本文中揭示之方法考慮。

A. 步驟A：獲得患者腫瘤樣本

【0460】一般來說，TIL最初獲自患者腫瘤樣本(「初代TIL」)且接著擴增成較大族群以進行如本文中描述之進一步操作，視需要冷凍保存、如本文概述之再刺激及視需要評估表型及代謝參數作為TIL健康的指標。

【0461】患者腫瘤樣本可使用所屬技術領域中已知之方法獲得，通常經由手術部分切除、針吸活體組織切片或其他用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的手段。一般來說，腫瘤樣本可來自任何實質腫瘤，包括原發性腫瘤、侵入性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣本亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病的腫瘤。實質腫瘤可為任何癌症種類，包括但不限於乳癌、胰癌、前列腺癌、結直腸癌、肺癌、腦癌、腎癌、胃癌及皮膚癌(包括但不限於鱗狀細胞癌、基底細胞癌及黑色素瘤)。在一些實施態樣

中，有用的TIL獲自惡性黑色素瘤腫瘤，因為報告指出這些腫瘤具有特別高含量的TIL。

【0462】 用語「實質腫瘤」係指組織的異常團塊，通常不含囊腫或液體區域。實質腫瘤可為良性或惡性。用語「實質腫瘤癌」係指惡性、腫瘤性或癌性實質腫瘤。實質腫瘤癌包括但不限於肉瘤、癌(carcinoma)及淋巴瘤，諸如肺癌、乳癌、三陰性乳癌、前列腺癌、結腸癌、直腸癌及膀胱癌。在一些實施態樣中，癌症係選自子宮頸癌、頭頸癌(包括例如頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠質母細胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌及非小細胞肺癌。實質腫瘤的組織結構包括相互依賴的組織隔室，包括實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支持性微環境的支持性基質細胞。

【0463】 用語「血液惡性病」係指哺乳動物造血及淋巴組織(包括但不限於血液、骨髓、淋巴結及淋巴系統的組織)的癌症及腫瘤。血液惡性病亦稱為「液體腫瘤」。血液惡性病包括但不限於急性淋巴母細胞白血病(ALL)、慢性淋巴球性淋巴瘤(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核球性白血病(AMoL)、何杰金氏淋巴瘤及非何杰金氏淋巴瘤。用語「B細胞血液惡性病」係指影響B細胞的血液惡性病。

【0464】 一旦獲得，腫瘤樣本通常使用銳器分割碎斷成介於1至約8 mm³之間的小片(small pieces)，且約2至3

mm³特別有用。TIL係自這些片段使用酶性腫瘤消化物培養。該腫瘤消化物可藉由在酶性介質(例如Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640緩衝劑、2 mM麩胺酸、10 mcg/mL建它黴素、30單位/mL的DNA酶及1.0 mg/mL的膠原酶)中孵養，隨後機械解離(例如使用組織解離器)產生。腫瘤消化物可藉由將腫瘤放入酶性介質中且機械解離腫瘤大約1分鐘，隨後在37°C下在5% CO₂中孵養30分鐘，隨後在前述條件下重複機械解離及孵養循環直到只有小組織片存在而產生。在此過程結束時，如果細胞懸浮液含有大量的紅血球或死亡細胞，可使用FICOLL分支親水性多醣執行密度梯度分離以移除這些細胞。可使用所屬技術領域中已知之替代方法，諸如該些在美國專利申請公開案第2012/0244133 A1號中描述者，其揭露以引用方式併入本文中。任何前述方法可用於本文所述之任何實施態樣中之擴增TIL之方法或治療癌症之方法。

【0465】一般來說，將收集到的細胞懸浮液稱為「初代細胞族群」或「新鮮收集」細胞族群。

【0466】在一些實施態樣中，碎斷包括物理碎斷，包括例如分割以及消化。在一些實施態樣中，碎斷係物理碎斷。在一些實施態樣中，碎斷係分割。在一些實施態樣中，碎斷係藉由消化。在一些實施態樣中，TIL最初可自獲自患者的酶性腫瘤消化物及腫瘤片段培養。在一實施態樣中，TIL最初可自獲自患者的酶性腫瘤消化物及腫瘤片段培養。

【0467】 在一些實施態樣中，當腫瘤是實質腫瘤時，在例如(如圖8中提供的)步驟A中獲得腫瘤樣本後，腫瘤進行物理碎斷。在一些實施態樣中，碎斷發生在冷凍保存之前。在一些實施態樣中，碎斷發生在冷凍保存之後。在一些實施態樣中，碎斷發生在獲得腫瘤之後且不進行任何冷凍保存。在一些實施態樣中，將腫瘤碎斷並將10、20、30、40或更多個片段或片放入各容器進行第一擴增。在一些實施態樣中，將腫瘤碎斷並將30或40個片段或片放入各容器進行第一擴增。在一些實施態樣中，將腫瘤碎斷並將40個片段或片放入各容器進行第一擴增。在一些實施態樣中，多個片段包含約4至約50個片段，其中各片段具有約 27 mm^3 的體積。在一些實施態樣中，多個片段包含約30至約60個片段，其總體積為約 1300 mm^3 至約 1500 mm^3 。在一些實施態樣中，多個片段包含約50個片段，其總體積為約 1350 mm^3 。在一些實施態樣中，多個片段包含約50個片段，其總質量為約1克至約1.5克。在一些實施態樣中，多個片段包含約4個片段。

【0468】 在一些實施態樣中，TIL係獲自腫瘤片段。在一些實施態樣中，腫瘤片段係藉由銳器分割獲得。在一些實施態樣中，腫瘤片段係介於約 1 mm^3 與 10 mm^3 之間。在一些實施態樣中，腫瘤片段係介於約 1 mm^3 與 8 mm^3 之間。在一些實施態樣中，腫瘤片段係約 1 mm^3 。在一些實施態樣中，腫瘤片段係約 2 mm^3 。在一些實施態樣中，腫瘤片段係約 3 mm^3 。在一些實施態樣中，腫瘤片段係約4

mm³。在一些實施態樣中，腫瘤片段係約5 mm³。在一些實施態樣中，腫瘤片段係約6 mm³。在一些實施態樣中，腫瘤片段係約7 mm³。在一些實施態樣中，腫瘤片段係約8 mm³。在一些實施態樣中，腫瘤片段係約9 mm³。在一些實施態樣中，腫瘤片段係約10 mm³。在一些實施態樣中，腫瘤係1-4 mm x 1-4 mm x 1-4 mm。在一些實施態樣中，腫瘤係1 mm x 1 mm x 1 mm。在一些實施態樣中，腫瘤係2 mm x 2 mm x 2 mm。在一些實施態樣中，腫瘤係3 mm x 3 mm x 3 mm。在一些實施態樣中，腫瘤係4 mm x 4 mm x 4 mm。

【0469】 在一些實施態樣中，腫瘤經部分切除以最小化各片上出血性、壞死及/或脂肪組織的量。在一些實施態樣中，腫瘤經部分切除以最小化各片上出血性組織的量。在一些實施態樣中，腫瘤經部分切除以最小化各片上壞死組織的量。在一些實施態樣中，腫瘤經部分切除以最小化各片上脂肪組織的量。

【0470】 在一些實施態樣中，腫瘤碎斷的執行是為了維持腫瘤內部結構。在一些實施態樣中，腫瘤碎斷的執行不包括使用解剖刀執行鋸切動作。在一些實施態樣中，TIL係獲自腫瘤消化物。在一些實施態樣中，腫瘤消化物的產製藉由在例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原酶的酶介質中孵養，隨後機械解離(GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA)而成。在將腫瘤放入酶介質後，可將腫瘤機

械解離大約1分鐘。接著可將溶液在37°C下在5% CO₂中孵養30分鐘，且接著再次機械破壞大約1分鐘。在37°C下在5% CO₂中再孵養30分鐘後，可將腫瘤機械破壞第三次大約1分鐘。在一些實施態樣中，在第三次機械破壞後如果大片組織仍然存在，則施加1或2次額外機械解離至樣本，不論是否再在37°C下在5% CO₂中孵養30分鐘。在一些實施態樣中，在最終孵養結束時，如果細胞懸浮液含有大量的紅血球或死亡細胞，可使用Ficoll執行密度梯度分離以移除這些細胞。

【0471】在一些實施態樣中，將第一擴增步驟之前收集到的細胞懸浮液稱為「初代細胞族群」或「新鮮收集」細胞族群。

【0472】在一些實施態樣中，細胞可在樣本收集後視需要冷凍且在進入步驟B描述的擴增之前冷凍儲存，該步驟B在以下進一步詳細描述且在圖8中例示。

B. 步驟B：第一擴增

【0473】在一些實施態樣中，本方法提供獲得年輕TIL，該年輕TIL在投予至個體/患者後能夠增加複製循環且因此相較於較老TIL(即在投予至個體/患者之前已進一步進行更多次複製的TIL)可能提供額外治療好處。年輕TIL的特徵已在文獻中描述，例如 Donia, et al., *Scandinavian Journal of Immunology*, 75:157-167 (2012); Dudley et al., *Clin Cancer Res*, 16:6122-6131 (2010);

Huang et al., *J Immunother*, 28(3):258-267 (2005); Besser et al., *Clin Cancer Res*, 19(17):OF1-OF9 (2013); Besser et al., *J Immunother* 32:415-423 (2009); Robbins, et al., *J Immunol* 2004; 173:7125-7130; Shen et al., *J Immunother*, 30:123-129 (2007); Zhou, et al., *J Immunother*, 28:53-62 (2005); 及 Tran, et al., *J Immunother*, 31:742-751 (2008), 所有全文皆以引用方式併入本文中。

【0474】 T及B淋巴球的多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段的體細胞重組產生。這些基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)的結合特異性及下游應用。本發明提供產製展現及增加T細胞貯庫多樣性之TIL的方法。在一些實施態樣中，藉由本方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施態樣中，藉由本方法獲得之TIL相較於新鮮收集TIL及/或使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8中體現之方法以外的方法)製備的TIL，展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施態樣中，藉由本方法獲得之TIL相較於新鮮收集TIL及/或使用稱為過程1C之方法(如在圖13所例示者)製備的TIL，展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施態樣中，在第一擴增獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施態樣中，增加多樣性是增加免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施態樣中，多樣性存在免疫球蛋白中、存在免疫球蛋白重鏈中。在一些實施態樣中，多樣性

存在免疫球蛋白中、存在免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施態樣中，多樣性存在T細胞受體中。在一些實施態樣中，多樣性存在選自由 α 、 β 、 γ 及 δ 受體所組成之群組的T細胞受體中之一者中。在一些實施態樣中，T細胞受體(TCR) α 及/或 β 的表現增加。在一些實施態樣中，T細胞受體(TCR) α 的表現增加。在一些實施態樣中，T細胞受體(TCR) β 的表現增加。在一些實施態樣中，TCRab(即TCR α/β)的表現增加。

【0475】 在例如諸如圖8步驟A所述之分割或消化腫瘤片段之後，將所得細胞在有利TIL但不利腫瘤及其他細胞生長的條件下於含有IL-2的血清中培養。在一些實施態樣中，將腫瘤消化物孵養於2 mL孔中的包含去活化人AB血清及6000 IU/mL IL-2的介質中。將此初代細胞族群培養數天期間(通常3至14天)，導致通常約 1×10^8 個主體TIL細胞的主體TIL族群。在一些實施態樣中，將此初代細胞族群培養7至14天，導致通常約 1×10^8 個主體TIL細胞的主體TIL族群。在一些實施態樣中，將此初代細胞族群培養10至14天，導致通常約 1×10^8 個主體TIL細胞的主體TIL族群。在一些實施例中，將此初代細胞族群培養約11天，導致通常約 1×10^8 主體TIL細胞的主體TIL族群。

【0476】 在一較佳實施態樣中，TIL的擴增可使用如以下及本文所述的初始主體TIL擴增步驟(例如諸如該些圖8步驟B中所述者，其可包括稱為REP前的過程)執行，隨後執行如以下步驟D及本文所述的第二擴增(步驟D，包括

稱為快速擴增規程(REP)步驟的過程)，隨後執行可選的冷凍保存，及隨後執行如以下及本文所述的第二步驟D(包括稱為再刺激REP步驟的過程)。獲自此過程的TIL可如本文所述之視需要以表型特徵及代謝參數表徵。

【0477】在TIL培養起始於24孔板(例如使用Costar 24孔平底細胞培養盤(Corning Incorporated, Corning, NY))的實施態樣中，各孔可接種 1×10^6 個腫瘤消化細胞或一個腫瘤片段於含IL-2 (6000 IU/mL; Chiron Corp., Emeryville, CA)的2 mL完全培養基(CM)中。在一些實施態樣中，腫瘤片段係介於約 1 mm^3 與 10 mm^3 之間。

【0478】在一些實施態樣中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基的縮寫)。在一些實施態樣中，步驟B的CM係由補充有10%人AB血清、25 mM HEPES及10 mg/mL建它黴素之含GlutaMAX的RPMI 1640組成。在培養起始於具有40 mL容量及 10 cm^2 氣體可通透矽底的氣體可通透培養瓶(例如G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN)的實施態樣中(圖1)，各培養瓶裝載10至 40×10^6 存活腫瘤消化細胞或5至30個腫瘤片段於10至40 mL之含IL-2的CM中。G-Rex10及24孔板皆孵養於 37°C 下5% CO_2 的增濕孵養箱中，在培養起始後5天，將半數介質移除並置換成新鮮CM及IL-2，且在第5天後，每2至3天更換半數介質。

【0479】在製備腫瘤片段後，將所得細胞(即片段)在有利TIL但不利腫瘤及其他細胞生長的條件下培養於含有IL-2的血清中。在一些實施態樣中，將腫瘤消化物孵養於

2 mL孔中的包含去活化人AB血清(或在一些如本文概述之情況下，在aAPC細胞族群存在下)及6000 IU/mL IL-2的介質中。將此初代細胞族群培養數天期間(通常10至14天)，導致通常約 1×10^8 主體TIL細胞的主體TIL族群。在一些實施態樣中，在第一擴增期間的生長介質包含IL-2或其變體。在一些實施態樣中，該IL係重組人IL-2 (rhIL-2)。在一些實施態樣中，IL-2儲備溶液的1 mg小瓶具有20至 30×10^6 IU/mg的比活性。在一些實施態樣中，IL-2儲備溶液的1 mg小瓶具有 20×10^6 IU/mg的比活性。在一些實施態樣中，IL-2儲備溶液的1 mg小瓶具有 25×10^6 IU/mg的比活性。在一些實施態樣中，IL-2儲備溶液的1 mg小瓶具有 30×10^6 IU/mg的比活性。在一些實施態樣中，IL-2儲備溶液具有4至 8×10^6 IU/mg的IL-2之最終濃度。在一些實施態樣中，IL-2儲備溶液具有5至 7×10^6 IU/mg的IL-2之最終濃度。在一些實施態樣中，IL-2儲備溶液具有 6×10^6 IU/mg的IL-2之最終濃度。在一些實施態樣中，IL-2儲備溶液係如實例4所述製備。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約10,000 IU/mL的IL-2、約9,000 IU/mL的IL-2、約8,000 IU/mL的IL-2、約7,000 IU/mL的IL-2、約6000 IU/mL的IL-2或約5,000 IU/mL的IL-2。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約9,000 IU/mL的IL-2至約5,000 IU/mL的IL-2。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約8,000 IU/mL的IL-2至約6,000 IU/mL的IL-2。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約7,000 IU/mL的IL-2至約6,000

IU/mL的IL-2。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約6,000 IU/mL的IL-2。在一實施態樣中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施態樣中，細胞培養基包含約3000 IU/mL的IL-2。在一實施態樣中，細胞培養基進一步包含IL-2。在較佳實施態樣中，細胞培養基包含約3000 IU/mL的IL-2。在一實施態樣中，細胞培養基包含約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL的IL-2。在一實施態樣中，細胞培養基包含介於1000與2000 IU/mL之間、介於2000與3000 IU/mL之間、介於3000與4000 IU/mL之間、介於4000與5000 IU/mL之間、介於5000與6000 IU/mL之間、介於6000與7000 IU/mL之間、介於7000與8000 IU/mL之間或約8000 IU/mL的IL-2。

【0480】在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約500 IU/mL的IL-15、約400 IU/mL的IL-15、約300 IU/mL的IL-15、約200 IU/mL的IL-15、約180 IU/mL的IL-15、約160 IU/mL的IL-15、約140 IU/mL的IL-15、約120 IU/mL的IL-15或約100 IU/mL的IL-15。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約500 IU/mL的IL-15至約100 IU/mL的IL-15。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約400 IU/mL的IL-15至約100 IU/mL的IL-15。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約300 IU/mL的IL-15至約100 IU/mL的IL-

15。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約200 IU/mL的IL-15。在一些實施態樣中，細胞培養基包含約180 IU/mL的IL-15。在一實施態樣中，細胞培養基進一步包含IL-15。在較佳實施態樣中，細胞培養基包含約180 IU/mL的IL-15。

【0481】 在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約20 IU/mL的IL-21、約15 IU/mL的IL-21、約12 IU/mL的IL-21、約10 IU/mL的IL-21、約5 IU/mL的IL-21、約4 IU/mL的IL-21、約3 IU/mL的IL-21、約2 IU/mL的IL-21、約1 IU/mL的IL-21或約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約20 IU/mL的IL-21至約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約15 IU/mL的IL-21至約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約12 IU/mL的IL-21至約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約10 IU/mL的IL-21至約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約5 IU/mL的IL-21至約1 IU/mL的IL-21。在一些實施態樣中，第一擴增培養基包含約2 IU/mL的IL-21。在一些實施態樣中，細胞培養基包含約1 IU/mL的IL-21。在一些實施態樣中，細胞培養基包含約0.5 IU/mL的IL-21。在一實施態樣中，細胞培養基進一步包含IL-21。在較佳實施態樣中，細胞培養基包含約1 IU/mL的IL-21。

【0482】 在一實施態樣中，細胞培養基包含OKT-3

抗體。在一些實施態樣中，細胞培養基包含約 30 ng/mL 的 OKT-3 抗體。在一實施態樣中，細胞培養基包含約 0.1 ng/mL、約 0.5 ng/mL、約 1 ng/mL、約 2.5 ng/mL、約 5 ng/mL、約 7.5 ng/mL、約 10 ng/mL、約 15 ng/mL、約 20 ng/mL、約 25 ng/mL、約 30 ng/mL、約 35 ng/mL、約 40 ng/mL、約 50 ng/mL、約 60 ng/mL、約 70 ng/mL、約 80 ng/mL、約 90 ng/mL、約 100 ng/mL、約 200 ng/mL、約 500 ng/mL 及約 1 μ g/mL 的 OKT-3 抗體。在一實施態樣中，細胞培養基包含介於 0.1 ng/mL 與 1 ng/mL 之間、介於 1 ng/mL 與 5 ng/mL 之間、介於 5 ng/mL 與 10 ng/mL 之間、介於 10 ng/mL 與 20 ng/mL 之間、介於 20 ng/mL 與 30 ng/mL 之間、介於 30 ng/mL 與 40 ng/mL 之間、介於 40 ng/mL 與 50 ng/mL 之間及介於 50 ng/mL 與 100 ng/mL 之間的 OKT-3 抗體。在一些實施態樣中，細胞培養基不包含 OKT-3 抗體。

【0483】 在一些實施態樣中，細胞培養基包含一或多種 TNFRSF 促效劑於細胞培養基中。在一些實施態樣中，TNFRSF 促效劑包含 4-1BB 促效劑。在一些實施態樣中，TNFRSF 促效劑係 4-1BB 促效劑，且 4-1BB 促效劑係選自由烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白質及彼等之片段、衍生物、變體、生物類似物及組合所組成之群組。在一些實施態樣中，TNFRSF 促效劑的添加濃度足以在細胞培養基中達成介於 0.1 μ g/mL 與 100 μ g/mL 之間的濃度。在一些實施態樣中，TNFRSF 促效劑的添加濃度足以在細胞培養基中達成介於 20 μ g/mL 與 40 μ g/mL 之間的濃度。

【0484】在一些實施態樣中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包含初始濃度約3000 IU/mL的IL-2及初始濃度約30 ng/mL的OKT-3抗體，且其中一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【0485】在一些實施態樣中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基的縮寫)。在一些實施態樣中，其稱為CM1(培養基1)。在一些實施態樣中，CM係由補充有10%人AB血清、25 mM HEPES及10 mg/mL建它黴素之含GlutaMAX的RPMI 1640組成。在培養起始於具有40 mL容量及10 cm²氣體可通透矽底的氣體可通透培養瓶(例如G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN)的實施態樣中(圖1)，各培養瓶裝載10至40 x 10⁶存活腫瘤消化細胞或5至30個腫瘤片段於10至40mL之含IL-2的CM中。G-Rex10及24孔板皆孵養於37°C下5% CO₂的增濕孵養箱中，在培養起始後5天，將半數介質移除並置換成新鮮CM及IL-2，且在第5天後，每2至3天更換半數介質。在一些實施態樣中，CM係實例中所述的CM1，見實例5。在一些實施態樣中，第一擴增在初始細胞培養基或第一細胞培養基中發生。在一些實施態樣中，初始細胞培養基或第一細胞培養基包含IL-2。

【0486】在一些實施態樣中，第一擴增(包括諸如例如該些在圖8步驟B所述之過程，其可包括該些有時稱為REP前者)過程縮短至3至14天，如實例及圖式中所討論。在一些實施態樣中，第一擴增(包括諸如例如該些在圖8步

驟B所述之過程，其可包括該些有時稱為REP前者)過程縮短至7至14天，如實例中所討論且顯示於圖4及5，以及包括例如圖8步驟B所述之擴增。在一些實施態樣中，步驟B之第一擴增縮短至10至14天，如實例中所討論且顯示於圖4及5。在一些實施態樣中，第一擴增縮短至11天，如實例中所討論且顯示於圖4及5，以及包括例如圖8步驟B所述之擴增。

【0487】在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行1天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行2天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行3天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行4天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行5天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行6天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行7天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行8天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行9天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行10天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行11天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行12天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行13天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行1天至11天。在一些實施態樣中，第一TIL

擴增可進行2天至11天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行3天至11天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行4天至11天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行5天至11天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行6天至11天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行7天至11天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行8天至11天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行9天至11天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行10天至11天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行11天。

【0488】在一些實施態樣中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第一擴增期間之組合。在一些實施態樣中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及任何其組合可被包括在第一擴增期間，包括例如在根據圖8步驟B過程期間以及如本文所述者。在一些實施態樣中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第一擴增期間之組合。在一些實施態樣中，IL-2、IL-15及IL-21以及任何其組合可被包括在根據圖8步驟B過程期間以及如本文所述者。

【0489】在一些實施態樣中，第一擴增(包括稱為REP前的過程；例如根據圖8之步驟B)過程縮短至3至14天，如實例及圖式中所討論。在一些實施態樣中，步驟B之第一擴增縮短至7至14天，如實例中所討論且顯示於圖4及5。在一些實施態樣中，步驟B之第一擴增縮短至10至14天，如實例中所討論且顯示於圖4、5、6及7。在一些實施態樣中，第一擴增縮短至11天，如實例中所討論且顯示於圖

4、5、6及7。

【0490】在一些實施態樣中，第一擴增(例如根據圖8之步驟B)係於密閉系統生物反應器中執行。在一些實施態樣中，採用密閉系統進行如本文所述之TIL擴增。在一些實施態樣中，採用單一生物反應器。在一些實施態樣中，所採用的單一生物反應器係例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施態樣中，密閉系統生物反應器係單一生物反應器。

【0491】在一些實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA，以選自由0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、2 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質或10 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質所組成之群組的量在第一擴增期間(例如根據圖8之步驟B)添加至包含TIL及其他劑之細胞培養基。在一些實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA在第一擴增期間(例如根據圖8之步驟B)，以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至TIL培養。在一實施態樣中，可將一

或多種靶向如本文所述之基因包括 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 之 sd-RNA 在第一擴增期間(例如根據圖 8 之步驟 B)，以選自由 0.1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、2 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL 或 10 μM sd-RNA/10,000 個 TIL 所組成之群組的量添加至包含 TIL 及其他劑之細胞培養基。在一實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 之 sd-RNA 在第一擴增期間(例如根據圖 8 之步驟 B)，以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至 TIL 培養。

C. 步驟 C：第一擴增至第二擴增的轉變

【0492】在一些情況下，獲自第一擴增的主體 TIL 族群包括例如獲自例如圖 8 所示之步驟 B 的 TIL 族群可使用本文以下討論的規程立即冷凍保存。替代地，獲自第一擴增的 TIL 族群(稱為第二 TIL 族群)可進行第二擴增(其可包括有時稱為 REP 的擴增)且接著如以下討論進行冷凍保存。類似地，在其中基因修飾的 TIL 將用於療法中的情況中，第一 TIL 族群(有時稱為主體 TIL 族群)或第二 TIL 族群(其在一些實施態樣中可包括稱為 REP TIL 族群的族群)可在擴增之前或在第一擴增之後且在第二擴增之前經受基因修飾以用於

合適治療。

【0493】 在一些實施態樣中，獲自第一擴增(例如圖8所示之步驟B)的TIL係經儲存直到為了選擇而測定表型。在一些實施態樣中，獲自第一擴增(例如圖8所示之步驟B)的TIL不經儲存且直接進行第二擴增。在一些實施態樣中，獲自第一擴增的TIL在第一擴增之後且在第二擴增之前不經冷凍保存。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約3天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約4天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約4天至10天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約7天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約14天。

【0494】 在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的1天至14天。在一些實施態樣中，第一TIL擴增可進行2天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的3天至14天。在一些

實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的4天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的5天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的6天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的7天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的8天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的9天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的10天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的11天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的12天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的13天至14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的14天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的1天至11天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的2天至11天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的3天至11天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的4天至11天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的5天至11天。在一些實施態樣中，從第

一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的6天至11天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的7天至11天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的8天至11天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的9天至11天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的10天至11天。在一些實施態樣中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的11天。

【0495】 在一些實施態樣中，TIL在第一擴增之後且在第二擴增之前不經儲存，且TIL直接進行第二擴增(例如在一些實施態樣中，在如圖8所示的從步驟B至步驟D的轉變期間並不經儲存)。在一些實施態樣中，轉變在如本文所述之密閉系統中發生。在一些實施態樣中，來自第一擴增的TIL(第二TIL族群)直接進行第二擴增而無轉變期。

【0496】 在一些實施態樣中，從第一擴增至第二擴增的轉變(例如根據圖8之步驟C)係於密閉系統生物反應器中執行。在一些實施態樣中，採用密閉系統進行如本文所述之TIL擴增。在一些實施態樣中，採用單一生物反應器。在一些實施態樣中，所採用的單一生物反應器係例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施態樣中，密閉系統生物反應器係單一生物反應器。

【0497】 在一些實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB

之 sd-RNA，以選自由 0.1 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、0.5 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、0.75 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、1 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、1.25 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、1.5 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、2 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、5 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質或 10 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質所組成之群組的量在從第一擴增至第二擴增的轉變期間(例如根據圖 8 之步驟 C)添加至包含 TIL 及其他劑之細胞培養基。在一些實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 之 sd-RNA 在從第一擴增至第二擴增的轉變期間(例如根據圖 8 之步驟 C)，以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至 TIL 培養。在一實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 之 sd-RNA 在從第一擴增至第二擴增的轉變期間(例如根據圖 8 之步驟 C)，以選自由 0.1 μM sd-RNA/10,000個 TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000個 TIL、1 μM sd-RNA/10,000個 TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000個 TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000個 TIL、2 μM sd-RNA/10,000個 TIL、5 μM sd-RNA/10,000個 TIL 或 10 μM sd-RNA/10,000個 TIL 所組成之群組的量添加至包含 TIL 及其他劑之細胞培養基。在一實施態樣中，可將一或多種靶

向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA在從第一擴增至第二擴增的轉變期間(例如根據圖8之步驟C)，以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至TIL培養。

1.細胞介素

【0498】 本文所述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別是IL-2)的培養基，如所屬技術領域中所知。

【0499】 替代地，使用細胞介素之組合以進行TIL的快速擴增及或第二擴增是額外可能的，如同大致上在國際專利公開號WO 2015/189356及W國際專利公開號WO 2015/189357中概述的二或更多種IL-2、IL-15及IL-21的組合，特此明白將全文以引用方式併入本文中。因此，可能的組合包括IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施態樣中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於淋巴球產製，且特別是如其中所述的T細胞。

D.步驟D：第二擴增

【0500】 在一些實施態樣中，TIL細胞族群於數量上在收集及初始主體處理(例如圖8所示之步驟A及步驟B)及轉變(稱為步驟C)之後擴增。此進一步擴增在本文中稱為第二擴增，其可包括在所屬技術領域中通常稱為快速擴增

過程(REP；如圖8步驟D所示之過程)的擴增過程。第二擴增通常使用包含一些組分(包括餵養細胞、細胞介素來源及抗CD3抗體)的培養基在氣體可通透容器中完成。

【0501】在一些實施態樣中，TIL的第二擴增或第二TIL擴增(其可包括有時稱為REP的擴增；以及如圖8步驟D所示之過程)可使用任何所屬技術領域中具有通常知識者所知之TIL培養瓶或容器執行。在一些實施態樣中，第二TIL擴增可進行7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些實施態樣中，第二TIL擴增可進行約7天至約14天。在一些實施態樣中，第二TIL擴增可進行約8天至約14天。在一些實施態樣中，第二TIL擴增可進行約9天至約14天。在一些實施態樣中，第二TIL擴增可進行約10天至約14天。在一些實施態樣中，第二TIL擴增可進行約11天至約14天。在一些實施態樣中，第二TIL擴增可進行約12天至約14天。在一些實施態樣中，第二TIL擴增可進行約13天至約14天。在一些實施態樣中，第二TIL擴增可進行約14天。

【0502】在一實施態樣中，第二擴增可在氣體可通透容器中使用本揭露之方法(包括例如稱為REP之擴增；以及如圖8步驟D所示之過程)執行。例如，TIL可在介白素2(IL-2)或介白素15(IL-15)存在下使用非特異性T細胞受體刺激快速擴增。非特異性T細胞受體刺激可包括例如抗CD3抗體諸如約30 ng/ml的OKT3、小鼠單株抗CD3抗體(可購自Ortho-McNeil, Raritan, NJ or Miltenyi Biotech,

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

【0503】在一實施態樣中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施態樣中，細胞培養基包含約3000 IU/mL的IL-2。在一實施態樣中，細胞培養基包含約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL的IL-2。在一實施態樣中，細胞培養基包含介於1000與2000

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

【0504】在一實施態樣中，細胞培養基包含 OKT-3 抗體。在一些實施態樣中，細胞培養基包含約 30 ng/mL 的 OKT-3 抗體。在一實施態樣中，細胞培養基包含約 0.1 ng/mL、約 0.5 ng/mL、約 1 ng/mL、約 2.5 ng/mL、約 5 ng/mL、約 7.5 ng/mL、約 10 ng/mL、約 15 ng/mL、約 20 ng/mL、約 25 ng/mL、約 30 ng/mL、約 35 ng/mL、約 40 ng/mL、約 50 ng/mL、約 60 ng/mL、約 70 ng/mL、約 80 ng/mL、約 90 ng/mL、約 100 ng/mL、約 200 ng/mL、約 500 ng/mL 及約 1 μ g/mL 的 OKT-3 抗體。在一實施態樣中，細胞培養基包含介於 0.1 ng/mL 與 1 ng/mL 之間、介於 1 ng/mL 與 5 ng/mL 之間、介於 5 ng/mL 與 10 ng/mL 之間、介於 10 ng/mL 與 20 ng/mL 之間、介於 20 ng/mL 與 30 ng/mL 之間、介於 30 ng/mL 與 40 ng/mL 之間、介於 40 ng/mL 與 50 ng/mL 之間及介於 50 ng/mL 與 100 ng/mL 之間的 OKT-3 抗體。在一些實施態樣中，細胞培養基不包含 OKT-3 抗體。

【0505】在一些實施態樣中，細胞培養基包含一或多種 TNFRSF 促效劑於細胞培養基中。在一些實施態樣中，TNFRSF 促效劑包含 4-1BB 促效劑。在一些實施態樣中，TNFRSF 促效劑係 4-1BB 促效劑，且 4-1BB 促效劑係選自由烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白質及彼等之

片段、衍生物、變體、生物類似物及組合所組成之群組。在一些實施態樣中，TNFRSF促效劑的添加濃度足以在細胞培養基中達成介於0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間的濃度。在一些實施態樣中，TNFRSF促效劑的添加濃度足以在細胞培養基中達成介於20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間的濃度。

【0506】 在一些實施態樣中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包含初始濃度約3000 IU/mL的IL-2及初始濃度約30 ng/mL的OKT-3抗體，且其中一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【0507】 在一些實施態樣中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施態樣中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及任何其組合可被包括在第二擴增期間，包括例如在根據圖8步驟D過程期間以及如本文所述者。在一些實施態樣中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施態樣中，IL-2、IL-15及IL-21以及任何其組合可被包括在根據圖8步驟D過程期間以及如本文所述者。

【0508】 在一些實施態樣中，第二擴增可在包含IL-2、OKT-3、抗原呈現餵養細胞及視需要TNFRSF促效劑的經補充的細胞培養基中進行。在一些實施態樣中，第二擴增在經補充的細胞培養基中發生。在一些實施態樣中，經補充的細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現餵養細胞。在一些實施態樣中，第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC；亦稱為抗原呈現餵養細胞)。在一

些實施態樣中，第二擴增在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現
餵養細胞(即抗原呈現細胞)的細胞培養基中發生。

【0509】 在一些實施態樣中，第二擴增培養基包含約
500 IU/mL的IL-15、約400 IU/mL的IL-15、約300 IU/mL的
IL-15、約200 IU/mL的IL-15、約180 IU/mL的IL-15、約
160 IU/mL的IL-15、約140 IU/mL的IL-15、約120 IU/mL的
IL-15或約100 IU/mL的IL-15。在一些實施態樣中，第二擴
增培養基包含約500 IU/mL的IL-15至約100 IU/mL的IL-
15。在一些實施態樣中，第二擴增培養基包含約400 IU/mL
的IL-15至約100 IU/mL的IL-15。在一些實施態樣中，第二
擴增培養基包含約300 IU/mL的IL-15至約100 IU/mL的IL-
15。在一些實施態樣中，第二擴增培養基包含約200 IU/mL
的IL-15。在一些實施態樣中，細胞培養基包含約180
IU/mL的IL-15。在一實施態樣中，細胞培養基進一步包含
IL-15。在較佳實施態樣中，細胞培養基包含約180 IU/mL
的IL-15。

【0510】 在一些實施態樣中，第二擴增培養基包含約
20 IU/mL的IL-21、約15 IU/mL的IL-21、約12 IU/mL的IL-
21、約10 IU/mL的IL-21、約5 IU/mL的IL-21、約4 IU/mL
的IL-21、約3 IU/mL的IL-21、約2 IU/mL的IL-21、約1
IU/mL的IL-21或約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施態樣
中，第二擴增培養基包含約20 IU/mL的IL-21至約0.5
IU/mL的IL-21。在一些實施態樣中，第二擴增培養基包含
約15 IU/mL的IL-21至約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施態

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

【0511】在一些實施態樣中，抗原呈現餵養細胞 (APC) 係 PBMC。在一實施態樣中，在快速擴增及/或第二擴增中 TIL 對 PBMC 及/或抗原呈現細胞的比例係約 1 比 25、約 1 比 50、約 1 比 100、約 1 比 125、約 1 比 150、約 1 比 175、約 1 比 200、約 1 比 225、約 1 比 250、約 1 比 275、約 1 比 300、約 1 比 325、約 1 比 350、約 1 比 375、約 1 比 400 或約 1 比 500。在一實施態樣中，在快速擴增及/或第二擴增中 TIL 對 PBMC 的比例係介於 1 至 50 及 1 至 300 之間。在一實施態樣中，在快速擴增及/或第二擴增中 TIL 對 PBMC 的比例係介於 1 至 100 及 1 至 200 之間。

【0512】在一實施態樣中，REP 及/或第二擴增係在培養瓶中執行，其中主體 TIL 與 100 或 200 倍過量的去活化餵養細胞、30 mg/mL OKT3 抗 CD3 抗體及 3000 IU/mL IL-2 在 150 ml 介質中混合。置換介質 (通常經由抽吸新鮮介質置換

2/3介質)直到細胞轉移至替代性生長室。替代性生長室包括G-REX培養瓶及如以下更完整討論之氣體可通透容器。

【0513】在一些實施態樣中，第二擴增(其可包括稱為REP過程的過程)縮短至7至14天，如實例及圖式中所討論。在一些實施態樣中，第二擴增縮短至11天。

【0514】在一實施態樣中，REP及/或第二擴增可使用T-175培養瓶及如先前描述之氣體可通透袋子(Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42)或氣體可通透培養器皿(G-Rex培養瓶)執行。在一些實施態樣中，第二擴增(包括稱為快速擴增之擴增)係於T-175培養瓶中執行，且可將懸浮於150 mL的介質中之約 1×10^6 TIL添加至各T-175培養瓶中。TIL可培養於CM及AIM-V介質的1比1混合物中，補充有每mL 3000 IU的IL-2及每ml 30 ng的抗CD3。T-175培養瓶可在37°C下在5% CO₂中孵養。一半的介質可在第5天使用含有每mL 3000 IU的IL-2之50/50介質交換。在一些實施態樣中，在第7天可將來自二個T-175培養瓶的細胞組合於3 L袋子中並將300 mL含有5%人AB血清及每mL 3000 IU的IL-2之AIM V添加至300 ml的TIL懸浮液。各袋中的細胞數量每天或每二天計算一次，且添加新鮮介質以保持細胞計數介於 0.5 與 2.0×10^6 個細胞/mL。

【0515】在一實施態樣中，第二擴增(其可包括稱為REP之擴增，以及該些於圖8步驟D中指稱者)可在500 mL容量的具有100 cm氣體可通透矽底之氣體可通透培養瓶

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

【0516】在一實施態樣中，第二擴增(包括稱為REP之擴增)係在培養瓶中執行，其中主體TIL與100或200倍過量的去活化餵養細胞、30 mg/mL OKT3抗CD3抗體及3000 IU/mL IL-2在150 ml介質中混合。在一些實施態樣中，進行置換介質直到細胞轉移至替代性生長室。在一些實施態樣中，藉由抽吸新鮮介質置換掉2/3的介質。在一些實施態樣中，替代性生長室包括G-REX培養瓶及如以下更完整

討論之氣體可通透容器。

【0517】 在一實施態樣中，第二擴增(包括稱為REP之擴增)係經執行且進一步包含其中選擇優異腫瘤反應性之TIL的步驟。可使用任何所屬技術領域中已知之選擇方法。例如，美國專利申請公開案第2016/0010058 A1號(其揭露以引用方式併入本文中)所述之方法可用於選擇優異腫瘤反應性之TIL。

【0518】 視需要，在第二擴增(包括稱為REP擴增之擴增)之後可使用所屬技術領域中已知之標準測定執行細胞存活性測定。例如，可在主體TIL的樣本上進行台盼藍排除測定，其選擇性標示死亡細胞且允許存活性評估。在一些實施態樣中，TIL樣本可使用Cellometer K2自動細胞計數器(Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA)計算及判定存活性。在一些實施態樣中，存活性係根據例如實例15所述之細胞計數器K2 Image Cytometer自動細胞計數器規程判定。

【0519】 在一些實施態樣中，TIL之第二擴增(包括稱為REP之擴增)可使用如先前描述之T-175培養瓶及氣體可通透袋子(Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751及Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342)或氣體可通透G-Rex培養瓶執行。在一些實施態樣中，第二擴增使用培養瓶執行。在一些實施態樣中，第二擴增使用氣體可通透G-Rex培養瓶執行。在一些實施態樣中，第二擴增

係於 T-175 培養瓶中執行，且約 1×10^6 TIL 懸浮於約 150 mL 的介質中且將其添加至各 T-175 培養瓶中。將 TIL 與作為「餵養」細胞之經照射 (50 Gy) 的同種異體 PBMC 以 1 比 100 的比例培養，且將細胞培養於補充有 3000 IU/mL 的 IL-2 及 30 ng/mL 的抗 CD3 之 CM 與 AIM-V 介質的 1 比 1 混合物 (50/50 介質) 中。T-175 培養瓶在 37°C 下在 5% CO₂ 中孵養。在一些實施態樣中，一半的介質在第 5 天使用含有 3000 IU/mL 的 IL-2 之 50/50 介質更換。在一些實施態樣中，在第 7 天將來自 2 個 T-175 培養瓶的細胞組合於 3 L 袋子中，並將 300 mL 含有 5% 人 AB 血清及 3000 IU/mL 的 IL-2 之 AIM-V 添加至 300 mL 的 TIL 懸浮液。各袋中的細胞數量可每天或每二天計算一次，且可添加新鮮介質以保持細胞計數介於約 0.5 與約 2.0×10^6 個細胞/mL。

【0520】 在一些實施態樣中，第二擴增 (包括稱為 REP 之擴增) 在 500 mL 容量的具有 100 cm² 氣體可通透矽底之培養瓶 (G-Rex 100, Wilson Wolf) 中執行 (圖 1)，將約 5×10^6 或 10×10^6 TIL 與經照射的同種異體 PBMC 以 1 至 100 的比例培養於 400 mL 的補充有 3000 IU/mL 的 IL-2 及 30 ng/mL 的抗 CD3 之 50/50 介質中。G-Rex 100 培養瓶在 37°C 下在 5% CO₂ 中孵養。在一些實施態樣中，在第 5 天將 250 mL 的上清液移除並放入離心瓶且在 1500 rpm (491g) 下離心 10 分鐘。接著可將 TIL 團塊用 150 mL 的含有 3000 IU/mL 的 IL-2 之新鮮 50/50 介質再懸浮，並添加回原始 G-Rex 100 培養瓶。在將 TIL 在 G-Rex 100 培養瓶中連續擴增的實施態樣中，在第 7

天將各 G-Rex 100 中之 TIL 懸浮於存在於各培養瓶中之 300 mL 的介質中，且將細胞懸浮液分成用於接種 3 個 G-Rex 100 培養瓶之三個 100 mL 等分試樣。接著將 150 mL 之含有 5% 人 AB 血清及 3000 IU/mL 的 IL-2 的 AIM-V 添加至各培養瓶。G-Rex 100 培養瓶在 37°C 下在 5% CO₂ 中孵養，且在 4 天之後將 150 mL 之含有 3000 IU/mL 的 IL-2 的 AIM-V 添加至各 G-Rex 100 培養瓶。細胞在培養的第 14 天收集。

【0521】 T 及 B 淋巴球的多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段的體細胞重組產生。這些基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及 C(恆定區)決定免疫球蛋白及 T 細胞受體(TCR)的結合特異性及下游應用。本發明提供產製展現及增加 T 細胞貯庫多樣性之 TIL 的方法。在一些實施態樣中，藉由本方法獲得之 TIL 展現增加的 T 細胞貯庫多樣性。在一些實施態樣中，在第二擴增獲得之 TIL 展現增加的 T 細胞貯庫多樣性。在一些實施態樣中，增加多樣性是增加免疫球蛋白多樣性及/或 T 細胞受體多樣性。在一些實施態樣中，多樣性存在免疫球蛋白中、存在免疫球蛋白重鏈中。在一些實施態樣中，多樣性存在免疫球蛋白中、存在免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施態樣中，多樣性存在 T 細胞受體中。在一些實施態樣中，多樣性存在選自由 α 、 β 、 γ 及 δ 受體所組成之群組的 T 細胞受體中之一者中。在一些實施態樣中，T 細胞受體(TCR) α 及/或 β 的表現增加。在一些實施態樣中，T 細胞受體(TCR) α 的表現增加。在一些實施態樣中，T 細胞受體(TCR) β 的表現增加。

在一些實施態樣中，TCRab(即TCR α/β)的表現增加。

【0522】在一些實施態樣中，第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包含IL-2、OKT-3以及如以下更詳細討論之抗原呈現餵養細胞(APC)。

【0523】在一些實施態樣中，第二擴增(例如根據圖8之步驟D)係於密閉系統生物反應器中執行。在一些實施態樣中，採用密閉系統進行如本文所述之TIL擴增。在一些實施態樣中，採用單一生物反應器。在一些實施態樣中，所採用的單一生物反應器係例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施態樣中，密閉系統生物反應器係單一生物反應器。

【0524】在一些實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA，以選自由0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、2 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質或10 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質所組成之群組的量在第二擴增期間(例如根據圖8之步驟D)添加至包含TIL及其他劑之細胞培養基。在一些實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA在第二擴增期間

(例如根據圖8之步驟D)，以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至TIL培養。在一實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA在第二擴增期間(例如根據圖8之步驟D)，以選自由0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL、1 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、2 μM sd-RNA/10,000個TIL、5 μM sd-RNA/10,000個TIL或10 μM sd-RNA/10,000個TIL所組成之群組的量添加至包含TIL及其他劑之細胞培養基。在一實施態樣中，可將一或多種靶向如本文所述之基因包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB之sd-RNA在第二擴增期間(例如根據圖8之步驟D)，以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至TIL培養。

1. 餵養細胞及抗原呈現細胞

【0525】 在一實施態樣中，本文所述之第二擴增程序(例如包括諸如該些圖8步驟D所述以及該些稱為REP之擴增)在REP TIL擴增期間及/或在第二擴增期間需要過量的餵養細胞。在許多實施態樣中，餵養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。

【0526】一般來說，同種異體PBMC係經由照射或熱處理去活化，且如實例所述用於REP程序，其提供用於評估照射同種異體PBMC的複製不能之例示性規程。

【0527】在一些實施態樣中，如果第14天存活細胞總數小於在REP第0天及/或第二擴增第0天(即第二擴增的起始日)放入培養中的初始存活細胞數量，則認為PBMC是複製不能且接受其用於本文所述之TIL擴增程序。

【0528】在一些實施態樣中，如果在OKT3及IL-2存在下培養第7天及第14天的存活細胞總數並未從在REP第0天及/或第二擴增第0天(即第二擴增的起始日)放入培養中的初始存活細胞數量增加，則認為PBMC是複製不能且接受其用於本文所述之TIL擴增程序。在一些實施態樣中，PBMC在30 ng/ml OKT3抗體及3000 IU/ml IL-2存在下培養。。

【0529】在一些實施態樣中，如果在OKT3及IL-2存在下培養第7天及第14天的存活細胞總數並未從在REP第0天及/或第二擴增第0天(即第二擴增的起始日)放入培養中的初始存活細胞數量增加，則認為PBMC是複製不能且接受其用於本文所述之TIL擴增程序。在一些實施態樣中，PBMC在5至60 ng/ml OKT3抗體及1000至6000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施態樣中，PBMC在10至50 ng/ml OKT3抗體及2000至5000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施態樣中，PBMC在20至40 ng/ml OKT3抗體及2000至4000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施態樣中，PBMC在25至

35 ng/ml OKT3抗體及2500至3500 IU/ml IL-2存在下培養。

【0530】在一些實施態樣中，抗原呈現餵養細胞係PBMC。在一些實施態樣中，抗原呈現餵養細胞係人工抗原呈現餵養細胞。在一實施態樣中，在第二擴增中TIL對抗原呈現餵養細胞的比例係約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一實施態樣中，在第二擴增中TIL對抗原呈現餵養細胞的比例係介於1至50及1至300之間。在一實施態樣中，在第二擴增中TIL對抗原呈現餵養細胞的比例係介於1至100及1至200之間。

【0531】在一實施態樣中，本文所述之第二擴增程序需要約 2.5×10^9 餵養細胞對約 100×10^6 TIL的比例。在另一實施態樣中，本文所述之第二擴增程序需要約 2.5×10^9 餵養細胞對約 50×10^6 TIL的比例。在又一實施態樣中，本文所述之第二擴增程序需要約 2.5×10^9 餵養細胞對約 25×10^6 TIL。

【0532】在一實施態樣中，本文所述之第二擴增程序在第二擴增期間需要過量的餵養細胞。在許多實施態樣中，餵養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一實施態樣中，使用人工抗原呈現(aAPC)細胞代替PBMC。

【0533】一般來說，同種異體PBMC經由照射或熱處

理去活化，且用於本文所述之 TIL 擴增程序，包括在例如圖 4、5、6 及 7 中所述之例示性程序。

【0534】在一實施態樣中，在第二擴增中使用人工抗原呈現細胞來置換 PBMC 或與 PBMC 組合使用。

2. 細胞介素

【0535】本文所述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別是 IL-2)的培養基，如所屬技術領域中所知。

【0536】替代地，使用細胞介素之組合以進行 TIL 的快速擴增及或第二擴增是額外可能的，如同大致上在國際專利公開號 WO 2015/189356 及 W 國際專利公開號 WO 2015/189357 中概述的二或更多種 IL-2、IL-15 及 IL-21 的組合，特此明白將全文以引用方式併入本文中。因此，可能的組合包括 IL-2 及 IL-15、IL-2 及 IL-21、IL-15 及 IL-21 及 IL-2、IL-15 及 IL-21，其中後者在許多實施態樣中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於淋巴球產製，且特別是如其中所述的 T 細胞。

E. 步驟 E：收集 TIL

【0537】在第二擴增步驟之後，可收集細胞。在一些實施態樣中，在例如圖 8 所提供之一、二、三、四或更多個擴增步驟之後收集 TIL。在一些實施態樣中，在例如圖 8 所提供之二個擴增步驟之後收集 TIL。

【0538】TIL 可以任何適當且無菌之方式收集，包括

例如離心。收集 TIL 之方法係所屬技術領域中廣知的且本過程可採用任何該等已知之方法。在一些實施態樣中，使用自動化系統收集 TIL。

【0539】 細胞收集器及/或細胞處理系統可購自多個來源，包括例如 Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、Perkin Elmer 及 Inotech Biosystems International, Inc.。本方法可採用任何基於細胞的收集器。在一些實施態樣中，細胞收集器及/或細胞處理系統是基於膜的細胞收集器。在一些實施態樣中，細胞收集是經由細胞處理系統諸如 LOVO 系統(由 Fresenius Kabi 製造)進行。用語「LOVO 細胞處理系統」亦指由任何供應商製造的任何可將包含細胞的溶液泵送通過無菌及/或密閉系統環境中的膜或過濾器諸如旋轉膜或旋轉過濾器的儀器或裝置，允許連續流動及細胞處理以在無需團塊化下移除上清液或細胞培養基。在一些實施態樣中，細胞收集器及/或細胞處理系統可在密閉無菌系統中執行細胞分離、洗滌、流體交換、濃縮及/或其他細胞處理步驟。

【0540】 在一些實施態樣中，收集(例如根據圖 8 之步驟 E)係於密閉系統生物反應器中執行。在一些實施態樣中，採用密閉系統進行如本文所述之 TIL 擴增。在一些實施態樣中，採用單一生物反應器。在一些實施態樣中，所採用的單一生物反應器係例如 G-REX -10 或 G-REX -100。在一些實施態樣中，密閉系統生物反應器係單一生物反應器。

【0541】 在一些實施態樣中，根據圖8之步驟E係根據實例16所述之過程執行。在一些實施態樣中，密閉系統係在無菌條件下經由針筒進入以維持系統的無菌性及密閉特性。在一些實施態樣中，採用如實例16所述的密閉系統。

【0542】 在一些實施態樣中，根據實例16所述之方法收集TIL。在一些實施態樣中，使用如第8.5節所述之方法，收集介於第1天與第11天之間的TIL(在實例16中稱為第11天TIL收集)。在一些實施態樣中，使用如第8.12節所述之方法，收集介於第12天與第22天之間的TIL(在實例16中稱為第22天TIL收集)。

F. 步驟F：最終調配/轉移至輸注袋

【0543】 在如圖8以例示性順序提供且如以上及本文詳細概述之步驟A至E完成之後，將細胞轉移至容器以用於投予至患者。在一些實施態樣中，一旦使用上述之擴增方法獲得治療足夠數量的TIL後，將彼等轉移至容器以用於投予至患者。

【0544】 在一實施態樣中，使用本揭露之APC擴增之TIL係作為醫藥組成物投予至患者。在一實施態樣中，醫藥組成物係TIL於無菌緩衝劑中之懸浮液。本揭露之使用PBMC擴增之TIL可藉由所屬技術領域中已知之任何合適途徑投予。在一些實施態樣中，T細胞係作為單一動脈內或靜脈內輸注投予，其較佳地持續大約30至60分鐘。其他合適的投予途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴內。

1. 醫藥組成物、劑量及給藥方案

【0545】在一實施態樣中，使用本揭露之方法擴增之 TIL 係作為醫藥組成物投予至患者。在一實施態樣中，醫藥組成物係 TIL 於無菌緩衝劑中之懸浮液。本揭露之使用 PBMC 擴增之 TIL 可藉由所屬技術領域中已知之任何合適途徑投予。在一些實施態樣中，T 細胞係作為單一動脈內或靜脈內輸注投予，其較佳地持續大約 30 至 60 分鐘。其他合適的投予途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴內投予。

【0546】可投予任何合適劑量的 TIL。在一些實施態樣中，投予約 2.3×10^{10} 至約 13.7×10^{10} 個 TIL，平均約 7.8×10^{10} 個 TIL，特別是如果癌症係黑色素瘤。在一實施態樣中，投予約 1.2×10^{10} 至約 4.3×10^{10} 個 TIL。在一些實施態樣中，投予約 3×10^{10} 至約 12×10^{10} 個 TIL。在一些實施態樣中，投予約 4×10^{10} 至約 10×10^{10} 個 TIL。在一些實施態樣中，投予約 5×10^{10} 至約 8×10^{10} 個 TIL。在一些實施態樣中，投予約 6×10^{10} 至約 8×10^{10} 個 TIL。在一些實施態樣中，投予約 7×10^{10} 至約 8×10^{10} 個 TIL。在一些實施態樣中，治療有效劑量係約 2.3×10^{10} 至約 13.7×10^{10} 個。在一些實施態樣中，治療有效劑量係約 7.8×10^{10} 個 TIL，特別是癌症係黑色素瘤。在一些實施態樣中，治療有效劑量係約 1.2×10^{10} 至約 4.3×10^{10} 個 TIL。在一些實施態樣中，治療有效劑量係約 3×10^{10} 至約 12×10^{10} 個 TIL。在一些實施態樣中，治療有效劑量係約 4×10^{10} 至約 10×10^{10} 個 TIL。在一些實施態樣中，

治療有效劑量係約 5×10^{10} 至約 8×10^{10} 個TIL。在一些實施態樣中，治療有效劑量係約 6×10^{10} 至約 8×10^{10} 個TIL。在一些實施態樣中，治療有效劑量係約 7×10^{10} 至約 8×10^{10} 個TIL。

【0547】在一些實施態樣中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之數量係約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 及 9×10^{13} 。在一實施態樣中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之數量係在 1×10^6 至 5×10^6 、 5×10^6 至 1×10^7 、 1×10^7 至 5×10^7 、 5×10^7 至 1×10^8 、 1×10^8 至 5×10^8 、 5×10^8 至 1×10^9 、 1×10^9 至 5×10^9 、 5×10^9 至 1×10^{10} 、 1×10^{10} 至 5×10^{10} 、 5×10^{10} 至 1×10^{11} 、 5×10^{11} 至 1×10^{12} 、 1×10^{12} 至 5×10^{12} 及 5×10^{12} 至 1×10^{13} 的範圍內。

【0548】在一些實施態樣中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之濃度係小於例如100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、

15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v的醫藥組成物。

【0549】 在一些實施態樣中，提供於本發明之醫藥組成物中的 TIL 之濃度係大於 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、

0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v的醫藥組成物。

【0550】在一些實施態樣中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之濃度係在約0.0001%至約50%、約0.001%至約40%、約0.01%至約30%、約0.02%至約29%、約0.03%至約28%、約0.04%至約27%、約0.05%至約26%、約0.06%至約25%、約0.07%至約24%、約0.08%至約23%、約0.09%至約22%、約0.1%至約21%、約0.2%至約20%、約0.3%至約19%、約0.4%至約18%、約0.5%至約17%、約0.6%至約16%、約0.7%至約15%、約0.8%至約14%、約0.9%至約12%或約1%至約10% w/w、w/v或v/v的醫藥組成物的範圍內。

【0551】在一些實施態樣中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之濃度係在約0.001%至約10%、約0.01%至約5%、約0.02%至約4.5%、約0.03%至約4%、約0.04%至約3.5%、約0.05%至約3%、約0.06%至約2.5%、約0.07%至約2%、約0.08%至約1.5%、約0.09%至約1%、約0.1%至約0.9% w/w、w/v或v/v的醫藥組成物的範圍內。

【0552】在一些實施態樣中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之量等於或小於10 g、9.5 g、9.0 g、8.5 g、8.0 g、7.5 g、7.0 g、6.5 g、6.0 g、5.5 g、5.0 g、4.5 g、

4.0 g、3.5 g、3.0 g、2.5 g、2.0 g、1.5 g、1.0 g、0.95 g、0.9 g、0.85 g、0.8 g、0.75 g、0.7 g、0.65 g、0.6 g、0.55 g、0.5 g、0.45 g、0.4 g、0.35 g、0.3 g、0.25 g、0.2 g、0.15 g、0.1 g、0.09 g、0.08 g、0.07 g、0.06 g、0.05 g、0.04 g、0.03 g、0.02 g、0.01 g、0.009 g、0.008 g、0.007 g、0.006 g、0.005 g、0.004 g、0.003 g、0.002 g、0.001 g、0.0009 g、0.0008 g、0.0007 g、0.0006 g、0.0005 g、0.0004 g、0.0003 g、0.0002 g或0.0001 g。

【0553】在一些實施態樣中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之量大於0.0001 g、0.0002 g、0.0003 g、0.0004 g、0.0005 g、0.0006 g、0.0007 g、0.0008 g、0.0009 g、0.001 g、0.0015 g、0.002 g、0.0025 g、0.003 g、0.0035 g、0.004 g、0.0045 g、0.005 g、0.0055 g、0.006 g、0.0065 g、0.007 g、0.0075 g、0.008 g、0.0085 g、0.009 g、0.0095 g、0.01 g、0.015 g、0.02 g、0.025 g、0.03 g、0.035 g、0.04 g、0.045 g、0.05 g、0.055 g、0.06 g、0.065 g、0.07 g、0.075 g、0.08 g、0.085 g、0.09 g、0.095 g、0.1 g、0.15 g、0.2 g、0.25 g、0.3 g、0.35 g、0.4 g、0.45 g、0.5 g、0.55 g、0.6 g、0.65 g、0.7 g、0.75 g、0.8 g、0.85 g、0.9 g、0.95 g、1 g、1.5 g、2 g、2.5、3 g、3.5、4 g、4.5 g、5 g、5.5 g、6 g、6.5 g、7 g、7.5 g、8 g、8.5 g、9 g、9.5 g或10 g。

【0554】提供於本發明之醫藥組成物中的TIL在寬廣劑量範圍內有效。確切劑量將取決於投予途徑、化合物的

投予形式、所欲治療之個體的性別及年齡、所欲治療之個體的體重及主治醫師的偏好及經驗。若適當亦可使用 TIL 的臨床建立劑量。使用在本文中之方法所投予之醫藥組成物的量(諸如 TIL 的劑量)將取決於所欲治療之人或哺乳動物、病症或病況的嚴重性、投予速率、活性醫藥成分的體內配置(disposition)及處方醫師的考量。

【0555】在一些實施態樣中，TIL 可以單一劑量投予。該投予可為注射，例如靜脈注射。在一些實施態樣中，TIL 可以多個劑量投予。給藥可為每年一次、二次、三次、四次、五次、六次或多於六次。給藥可為一個月一次、每二週一次、每週一次或每二天一次。TIL 的投予可視需要持續進行。

【0556】在一些實施態樣中，TIL 的有效劑量係約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 及

9×10^{13} 。在一些實施態樣中，TIL的有效劑量係在 1×10^6 至 5×10^6 、 5×10^6 至 1×10^7 、 1×10^7 至 5×10^7 、 5×10^7 至 1×10^8 、 1×10^8 至 5×10^8 、 5×10^8 至 1×10^9 、 1×10^9 至 5×10^9 、 5×10^9 至 1×10^{10} 、 1×10^{10} 至 5×10^{10} 、 5×10^{10} 至 1×10^{11} 、 5×10^{11} 至 1×10^{12} 、 1×10^{12} 至 5×10^{12} 及 5×10^{12} 至 1×10^{13} 的範圍內。

【0557】在一些實施態樣中，TIL的有效劑量係在約0.01 mg/kg至約4.3 mg/kg、約0.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約0.3 mg/kg至約3.2 mg/kg、約0.35 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.15 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.3 mg/kg至約2.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1.7 mg/kg、約0.15 mg/kg至約1.3 mg/kg、約0.3 mg/kg至約1.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1 mg/kg、約0.55 mg/kg至約0.85 mg/kg、約0.65 mg/kg至約0.8 mg/kg、約0.7 mg/kg至約0.75 mg/kg、約0.7 mg/kg至約2.15 mg/kg、約0.85 mg/kg至約2 mg/kg、約1 mg/kg至約1.85 mg/kg、約1.15 mg/kg至約1.7 mg/kg、約1.3 mg/kg mg至約1.6 mg/kg、約1.35 mg/kg至約1.5 mg/kg、約2.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約2.3 mg/kg至約3.4 mg/kg、約2.4 mg/kg至約3.3 mg/kg、約2.6 mg/kg至約3.15 mg/kg、約2.7 mg/kg至約3 mg/kg、約2.8 mg/kg至約3 mg/kg或約2.85 mg/kg至約2.95 mg/kg的範圍內。

【0558】在一些實施態樣中，TIL的有效劑量係在約1 mg至約500 mg、約10 mg至約300 mg、約20 mg至約250 mg、約25 mg至約200 mg、約1 mg至約50 mg、約5 mg至約45 mg、約10 mg至約40 mg、約15 mg至約35 mg、約20 mg

至約30 mg、約23 mg至約28 mg、約50 mg至約150 mg、約60 mg至約140 mg、約70 mg至約130 mg、約80 mg至約120 mg、約90 mg至約110 mg或約95 mg至約105 mg、約98 mg至約102 mg、約150 mg至約250 mg、約160 mg至約240 mg、約170 mg至約230 mg、約180 mg至約220 mg、約190 mg至約210 mg、約195 mg至約205 mg或約198至約207 mg的範圍內。

【0559】有效量的TIL可以單一或多個劑量經由任何具有類似效用的可接受的藥劑投予模式投予，包括鼻內及經皮途徑、經由動脈內注射、靜脈內、腹膜內、腸胃外、肌肉內、皮下、局部、經由移植或經由吸入。

G.可選的細胞介質組分

1.抗CD3抗體

【0560】在一些實施態樣中，用於本文所述之擴增方法(包括該些稱為REP者，見例如圖A)中之培養基亦包括抗CD3抗體。抗CD3抗體與IL-2之組合誘導TIL族群中之T細胞活化及細胞分裂。此效應可見於全長抗體以及Fab及F(ab')₂片段，前者通常較佳；見例如Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719，全文特此以引用方式併入本文中。

【0561】所屬技術領域中具有通常知識者將會理解，一些合適的抗人CD3抗體可用於本發明，包括來自各種哺乳動物的抗人CD3多株及單株抗體，包括但不限於鼠、

人、靈長動物、大鼠及犬抗體。在具體實施態樣中，使用 OKT3 抗 CD3 抗體 (可購自 Ortho-McNeil, Raritan, NJ or Miltenyi Biotech, Auburn, CA)。

2.4-1BB (CD137)促效劑

【0562】在一實施態樣中，TNFRSF促效劑係4-1BB (CD137)促效劑。4-1BB促效劑可為任何所屬技術領域中已知之4-1BB結合分子。4-1BB結合分子可為能夠與人或哺乳動物4-1BB結合之單株抗體或融合蛋白質。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可包含免疫球蛋白分子之任何同型(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類型(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或亞型的免疫球蛋白重鏈。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可具有重鏈及輕鏈。如本文中所使用，用語結合分子亦包括抗體(包括全長抗體)、單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、人、人源化或嵌合抗體及抗體片段例如 Fab片段、F(ab')片段、由 Fab表現庫產生的片段、任何上述者之表位結合片段、及抗體之經工程改造形式例如與4-1BB結合之 scFv分子。在一實施態樣中，4-1BB促效劑係一種全人抗體的抗原結合蛋白質。在一實施態樣中，4-1BB促效劑係一種人源化抗體的抗原結合蛋白質。在一些實施態樣中，用於本揭示方法及組成物中之4-1BB促效劑包括抗4-1BB抗體、人抗4-1BB抗體、小鼠抗4-1BB抗體、哺乳動物抗4-1BB抗體、單株抗4-1BB抗體、多株

抗4-1BB抗體、嵌合抗4-1BB抗體、抗4-1BB粘連蛋白、抗4-1BB結構域抗體、單鏈抗4-1BB片段、重鏈抗4-1BB片段、輕鏈抗4-1BB片段、抗4-1BB融合蛋白質、及彼等之片段、衍生物、接合物、變體、或生物類似物。已知促效性抗4-1BB抗體可誘導強烈免疫反應。Lee, et al., PLOS One 2013, 8, e69677。在一較佳實施態樣中，4-1BB促效劑係促效性抗4-1BB人源化或全人類單株抗體(即衍生自單一細胞系之抗體)。在一實施態樣中，4-1BB促效劑係EU-101 (Eutilex Co. Ltd.)、烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或彼等之片段、衍生物、接合物、變體或生物類似物。在較佳實施態樣中，4-1BB促效劑係烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或彼等之片段、衍生物、接合物、變體或生物類似物。

【0563】在一較佳實施態樣中，4-1BB促效劑或4-1BB結合分子亦可為融合蛋白質。在一較佳實施態樣中，相較於一般擁有二個配體結合結構域的促效性單株抗體而言，多聚體4-1BB促效劑諸如三聚體或六聚體4-1BB促效劑(具有三個或六個配體結合結構域)可誘導優異的受體(4-1BBL)叢聚及內部細胞性傳訊複合物形成。包含三個TNFRSF結合結構域及IgG1-Fc且視需要進一步連接二或更多個這些融合蛋白質的三聚體(三價)或六聚體(或六價)或更大融合蛋白質係描述於例如Gieffers, et al., Mol. Cancer Therapeutics 2013, 12, 2735-47中。

【0564】已知促效性4-1BB抗體及融合蛋白質可誘導強烈免疫反應。在一較佳實施態樣中，4-1BB促效劑係以

足以減少毒性之方式與4-1BB抗原特異性結合的單株抗體或融合蛋白質。在一些實施態樣中，4-1BB促效劑係廢除抗體依賴性細胞毒性(ADCC)例如NK細胞細胞毒性之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白質。在一些實施態樣中，4-1BB促效劑係廢除抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白質。在一些實施態樣中，4-1BB促效劑係廢除補體依賴性細胞毒性(CDC)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白質。在一些實施態樣中，4-1BB促效劑係廢除Fc區功能性之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白質。

【0565】在一些實施態樣中，4-1BB促效劑係由以高親和性及促效性活性與人4-1BB (SEQ ID NO:9)結合來表徵。在一實施態樣中，4-1BB促效劑係與人4-1BB (SEQ ID NO:9)結合之結合分子。在一實施態樣中，4-1BB促效劑係與鼠4-1BB (SEQ ID NO:10)結合之結合分子。4-1BB促效劑或結合分子所結合之4-1BB抗原的胺基酸序列係總結於表3中。

表3：4-1BB抗原之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:9 人4-1BB, 腫瘤壞死因子受體超家族成員9(智人(<i>Homo sapiens</i>))	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR	60
	TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC	120
	CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE	180
	PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG	240
	CSCRFPEEEE GGCEL	255
SEQ ID NO:10 鼠4-1BB, 腫瘤壞死因子受體超家族成員9(家鼠(<i>Mus musculus</i>))	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN	60
	CNICRVCAGY FRFKKFCST HNAECEIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS	120
	LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSPSPST ISVTPEGGPG	180
	GHSLQVLTLE LALTSALLLA LIFITLLEFSV LKWIRKKEFPH IFKQFFKKT GAAQEEDACS	240
	CRCPQEEEGG GGGYEL	255

【0566】在一些實施態樣中，所述之組成物、過程及

方法包括以約 100 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 90 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 80 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 70 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 60 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 50 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 40 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB 或以約 30 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB 之 4-1BB 促效劑。

【0567】 在一些實施態樣中，所述之組成物、過程及方法包括以約 7.5×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 7.5×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 8×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 8.5×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 9×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 9.5×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合或以約 1×10^6 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合之 4-1BB 促效劑。

【0568】 在一些實施態樣中，所述之組成物、過程及方法包括以約 2×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 2.1×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 2.2×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 2.3×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 2.4×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 2.5×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 2.6×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合或以約

2.7×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 2.8×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 2.9×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合或以約 3×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合之 4-1BB 促效劑。

【0569】在一些實施態樣中，所述之組成物、過程及方法包括以約 10 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 9 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 8 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 7 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 6 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 5 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 4 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 3 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 2 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 4-1BB 結合或以約 1 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 4-1BB 結合之 4-1BB 促效劑。

【0570】在較佳實施態樣中，4-1BB 促效劑係烏圖木單抗 (亦稱為 PF-05082566 或 MOR-7480) 或其片段、衍生物、變體或生物類似物。烏圖木單抗可得自 Pfizer, Inc.。烏圖木單抗係免疫球蛋白 G2- λ 抗 [智人 TNFRSF9 (腫瘤壞死因子受體 (TNFR) 超家族成員 9, 4-1BB, T 細胞抗原 ILA, CD137)] 智人 (全人) 單株抗體。烏圖木單抗之胺基酸序列係如表 4 所示。烏圖木單抗包含位於 Asn59 及 Asn292 之醮化位點；位於位置 22 至 96 (V_H - V_L)、143 至 199 (C_H1 - C_L)、256 至 316 (C_H2) 及 362 至 420 (C_H3) 之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置 22' 至 87' (V_H - V_L) 及 136' 至 195' (C_H1 - C_L) 之輕鏈鏈內雙硫

鍵；位於IgG2A異構體位置218至218、219至219、222至222及225至225、位於IgG2A/B異構體位置218至130、219至219、222至222及225至225、及位於IgG2B異構體位置219至130 (2)、222至222及225至225之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及位於IgG2A異構體位置130至213' (2)、IgG2A/B異構體位置218至213'及130至213'及位於IgG2B異構體位置218至213' (2)之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏圖木單抗及其變體及片段之製備及特性係描述於美國專利第8,821,867、8,337,850及9,468,678號及國際專利申請公開案WO 2012/032433 A1，彼等各者之揭露以引用方式併入本文中。烏圖木單抗之臨床前特徵係描述於Fisher, et al., *Cancer Immunolog. & Immunother.* 2012, 61, 1721-33。目前烏圖木單抗在多種血液及實質腫瘤適應症之臨床試驗包括美國國家衛生研究院(U.S. National Institutes of Health) clinicaltrials.gov 識別號NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066及NCT02554812。

【0571】在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含由SEQ ID NO:11給出之重鏈及由SEQ ID NO:12給出之輕鏈。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含分別具有SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列具有至少99%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列具有至少98%一

致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0572】 在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含烏圖木單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施態樣中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:13所示之序列且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:14所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含scFv抗體，該scFv抗體包含各自與SEQ ID NO:13及SEQ ID

NO:14所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。

【0573】在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16及SEQ ID NO:17所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0574】在一實施態樣中，4-1BB促效劑係藥物管理機構參照烏圖木單抗所核准的4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一實施態樣中，生物類似物單株抗體包含4-1BB抗體，該4-1BB抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性(例如97%、98%、99%或100%序列一致性)之胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品係烏圖木單抗。在一些實施態樣中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醯化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施態樣中，生物類似物係經核准或申請核准之4-1BB促效劑抗體，其中該4-1BB促效劑抗體係提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物，其中該參考藥品或參考生物產品係烏圖木單抗。4-1BB促效劑抗體可由藥物管理機構諸如美國FDA及/或歐盟的EMA核准。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之

賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係烏圖木單抗。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係烏圖木單抗。

表 4：與烏圖木單抗相關之4-1BB促效劑抗體的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:11 烏圖木單抗重鏈	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN SFSFQGVTI SADKSI STAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KEKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVS LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYITLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFPYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKQSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
SEQ ID NO:12 烏圖木單抗輕鏈	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	60 120 180 214
SEQ ID NO:13 烏圖木單抗重鏈可變區	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGVTI SADKSI STAY LQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLTVVSS	60 118
SEQ ID NO:14 烏圖木單抗輕鏈可變區	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTKLTVL	60 108
SEQ ID NO:15 烏圖木單抗重鏈CDR1	STYWIS	6
SEQ ID NO:16 烏圖木單抗重鏈CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID NO:17 烏圖木單抗重鏈CDR3	RGYGIFDY	8
SEQ ID NO:18 烏圖木單抗輕鏈CDR1	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID NO:19 烏圖木單抗輕鏈CDR2	QDKNRPS	7
SEQ ID NO:20 烏圖木單抗輕鏈CDR3	ATYTGFGSLA V	11

【0575】在較佳實施態樣中，4-1BB促效劑係單株抗體烏瑞魯單抗(亦稱為BMS-663513及20H4.9.h4a)或其片段、衍生物、變體或生物類似物。烏瑞魯單抗可得自Bristol-Myers Squibb, Inc.及Creative Biolabs, Inc.。烏瑞魯單抗係免疫球蛋白G4-κ抗[智人TNFRSF9(腫瘤壞死因子受體超家族成員9，4-1BB，T細胞抗原ILA，CD137)]智人

(全人)單株抗體。烏瑞魯單抗之胺基酸序列係如表5所示。烏瑞魯單抗包含位於位置298(及298")之N-醯化位點；位於位置22至95 (V_H-V_L)、148至204 ($C_{H1}-C_L$)、262至322 (C_{H2})及368至426 (C_{H3})(及位於位置22"至95"、148"至204"、262"至322"及368"至426")之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置23'至88' (V_H-V_L)及136'至196' ($C_{H1}-C_L$)(及位於位置23"至88"及136"至196")之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於位置227至227"及230至230"之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及位於135至216'及135"至216"之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏瑞魯單抗及其變體及片段之製備及特性係描述於美國專利第7,288,638及8,962,804號，彼等揭露以引用方式併入本文中。烏瑞魯單抗之臨床前及臨床特徵係描述於 Segal, et al., Clin. Cancer Res. 2016, available at <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272>。目前烏瑞魯單抗在多種血液及實質腫瘤適應症之臨床試驗包括美國國家衛生研究院(U. S. National Institutes of Health)clinicaltrials.gov 識別號 NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992 及 NCT01471210。

【0576】在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含由SEQ ID NO:21給出之重鏈及由SEQ ID NO:22給出之輕鏈。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含分別具有SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID

NO:21及SEQ ID NO:22所示序列具有至少99%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列具有至少98%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0577】在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含烏瑞魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施態樣中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:23所示之序列且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:24所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含各自分別與

SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含scFv抗體，該scFv抗體包含各自與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。

【0578】在一實施態樣中，4-1BB促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26及SEQ ID NO:27所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29及SEQ ID NO:30所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0579】在一實施態樣中，4-1BB促效劑係藥物管理機構參照烏瑞魯單抗所核准的4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一實施態樣中，生物類似物單株抗體包含4-1BB抗體，該4-1BB抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性(例如97%、98%、99%或100%序列一致性)之胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品係烏瑞魯單抗。在一些實施態樣中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醣化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施態樣中，生物類似物係經核准或申請核准之4-1BB促效劑抗體，其中該4-1BB促效劑抗體係提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物，其中該參考藥品或參考生物產品係烏瑞魯單抗。4-1BB促效劑抗體可由藥物管理機構諸如美國

FDA及/或歐盟的EMA核准。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係烏瑞魯單抗。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係烏瑞魯單抗。

表 5：與烏瑞魯單抗相關之4-1BB促效劑抗體的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:21 烏瑞魯單抗重鏈	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTI S VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDY G PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTS G VHTFFPAVLQS SGLYSLS SSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDH K P SNTKVDK RVE SKYGPCCPEC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
SEQ ID NO:22 烏瑞魯單抗輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSV S SYLAWYQQK P GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQ Q RSNWPPALTF CGGKVEIKR TVAAPS VFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADY EK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
SEQ ID NO:23 烏瑞魯單抗 可變重鏈	MKHLWFFLL L VAAPRWLSQ VQLQQWGAG L LKPSETLSL T CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGE I NHGGYVTYNP SLESRVTI S V DTSKNQFSL K LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
SEQ ID NO:24 烏瑞魯單抗 可變輕鏈	MEAPQLFL L LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSV S SYLAWYQQK P GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQ Q	60 110
SEQ ID NO:25 烏瑞魯單抗重鏈CDR1	GYYS	5
SEQ ID NO:26 烏瑞魯單抗重鏈CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
SEQ ID NO:27 烏瑞魯單抗重鏈CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
SEQ ID NO:28 烏瑞魯單抗輕鏈CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:29 烏瑞魯單抗輕鏈CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:30 烏瑞魯單抗輕鏈CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【0580】在一實施態樣中，4-1BB促效劑係選自由下列所組成之群組：1D8、3Elor、4B4 (BioLegend 309809)、H4-

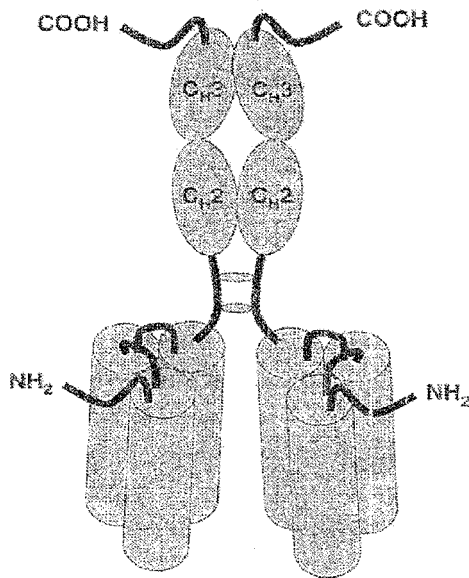
1BB-M127 (BD Pharmingen 552532)、BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX)、145501 (Leinco Technologies B591)、由寄存編號 ATCC No. HB-11248 之細胞系產生且揭示於美國專利第 6,974,863 號之抗體、5F4 (BioLegend 31 1503)、C65-485 (BD Pharmingen 559446)、揭示於美國專利申請公開案第 US 2005/0095244 號之抗體、揭示於美國專利第 7,288,638 號之抗體 (諸如 20H4.9-IgG1 (BMS-663031))、揭示於美國專利第 6,887,673 號之抗體 (諸如 4E9 或 BMS-554271)、揭示於美國專利第 7,214,493 號之抗體、揭示於美國專利第 6,303,121 號之抗體、揭示於美國專利第 6,569,997 號之抗體、揭示於美國專利第 6,905,685 號之抗體 (諸如 4E9 或 BMS-554271)、揭示於美國專利第 6,362,325 號之抗體 (諸如 1D8 或 BMS-469492 ; 3H3 或 BMS-469497 ; 或 3E1)、揭示於美國專利第 6,974,863 號之抗體 (諸如 53A2) ; 揭示於美國專利第 6,210,669 號之抗體 (諸如 1D8、3B8 或 3E1)、描述於美國專利第 5,928,893 號之抗體、揭示於美國專利第 6,303,121 號之抗體、揭示於美國專利第 6,569,997 號之抗體、揭示於國際專利申請公開案 WO 2012/177788、WO 2015/119923 及 WO 2010/042433 之抗體、及彼等之片段、衍生物、接合物、變體或生物類似物，其中前述專利或專利申請公開案各者之揭露以引用方式併入本文中。

【0581】在一實施態樣中，4-1BB 促效劑係國際專利申請公開案號 WO 2008/025516 A1、WO 2009/007120 A1、WO 2010/003766 A1、WO 2010/010051 A1 及 WO

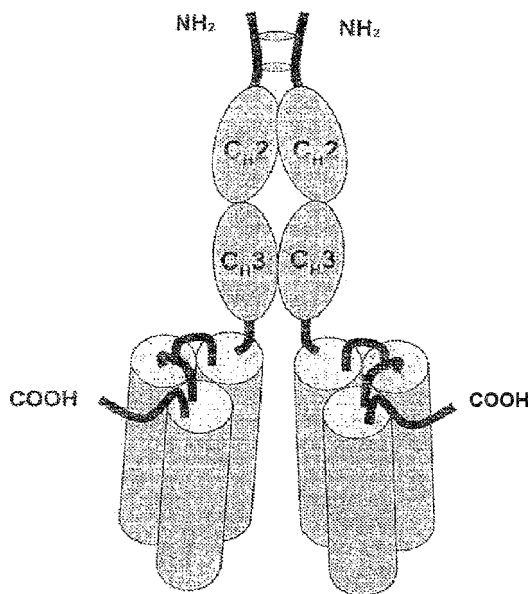
2010/078966 A1；美國專利申請公開案號US 2011/0027218 A1、US 2015/0126709 A1、US 2011/0111494 A1、US 2015/0110734 A1及US 2015/0126710 A1；及美國專利第9,359,420、9,340,599、8,921,519及8,450,460號所述之4-1BB促效性融合蛋白質，彼等揭露以引用方式併入本文中。

【0582】在一實施態樣中，4-1BB促效劑係如結構I-A(C端Fc-抗體片段融合蛋白質)或結構I-B(N端Fc-抗體片段融合蛋白質)所描繪之4-1BB促效性融合蛋白質、或彼等之片段、衍生物、接合物、變體或生物類似物：

(I-A)



(I-B)



在結構 I-A 及 I-B 中，圓柱體係指個別多肽結合結構域。結構 I-A 及 I-B 包含三個線性連接的衍生自例如 4-1BBL 或結合 4-1BB 之抗體的 TNFRSF 結合結構域，該 TNFRSF 結合結構域摺疊以形成三價蛋白質，其接著與第二三價蛋白質經由 IgG1-Fc (包括 C_H3 及 C_H2 結構域) 連接，接著用於經由雙硫鍵 (小長橢圓形) 將二個三價蛋白質連接在一起，穩

定結構且提供能夠將六個受體的細胞內傳訊結構域與傳訊蛋白質集合在一起以形成傳訊複合物的促效劑。表示為圓柱體的 TNFRSF 結合結構域可為 scFv 結構域，其包含例如由連接子連接的 V_H 及 V_L 鏈，該連接子可包含親水性殘基及提供柔軟度的 Gly 及 Ser 序列以及提供溶解度的 Glu 及 Lys。可使用任何 scFv 結構域設計，諸如該些描述於 de Marco, *Microbial Cell Factories*, 2011, 10, 44；Ahmad, et al., *Clin. & Dev. Immunol.* 2012, 980250；Monnier, et al., *Antibodies*, 2013, 2, 193-208；或在本文中他處參照併入者。此形式的融合蛋白質結構係描述於美國專利第 9,359,420、9,340,599、8,921,519 及 8,450,460 號，彼等揭露以引用方式併入本文中。

【0583】結構 I-A 之其他多肽結構域之胺基酸序列係在表 6 中給出。Fc 結構域較佳地包含完整恆定結構域 (SEQ ID NO:31 之胺基酸 17 至 230)、完整絞鏈結構域 (SEQ ID NO:31 之胺基酸 1 至 16) 或絞鏈結構域之一部分 (例如 SEQ ID NO:31 之胺基酸 4 至 16)。用於連接 C 端 Fc 抗體之較佳連接子可選自 SEQ ID NO:32 至 SEQ ID NO:41 給出之實施態樣，包括適用於融合額外多肽之連接子。

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

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:31 Fc 結構域	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKF KDTLMSRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
SEQ ID NO:32 連接子	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO:33 連接子	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO:34 連接子	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO:35 連接子	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO:36 連接子	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO:37 連接子	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO:38 連接子	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
SEQ ID NO:39 連接子	GGPGSSGSGS DKTHTCPPC APE	23
SEQ ID NO:40 連接子	GGPSSSGSK THTCPPCPA E	21
SEQ ID NO:41 連接子	GGSSSSSSSS GSKTHTCPP CPAPE	25

【0584】結構 I-B 之其他多肽結構域之胺基酸序列係在表 7 中給出。如果 Fc 抗體片段如結構 I-B 中融合至 TNFRSF 融合蛋白質的 N 端，則 Fc 模組的序列較佳地顯示於 SEQ ID NO:42，且連接子序列較佳地選自如 SEQ ID NO:43 至 SEQ ID NO:45 所示之該些實施態樣。

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

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

【0585】在一實施態樣中，根據結構 I-A 或 I-B 之 4-1BB 促效劑融合蛋白質包含一或多個選自由下列所組成之群組的 4-1BB 結合結構域：鳥圖木單抗之可變重鏈及可變

輕鏈、烏瑞魯單抗之可變重鏈及可變輕鏈、烏圖木單抗之可變重鏈及可變輕鏈、選自表8所述之可變重鏈及可變輕鏈的可變重鏈及可變輕鏈、前述可變重鏈及可變輕鏈之任何組合、及彼等之片段、衍生物、接合物、變體及生物類似物。

【0586】在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個4-1BB結合結構域，該4-1BB結合結構域包含4-1BBL序列。在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個4-1BB結合結構域，該4-1BB結合結構域包含根據SEQ ID NO:46之序列。在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個4-1BB結合結構域，該4-1BB結合結構域包含可溶性4-1BBL序列。在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個4-1BB結合結構域，該4-1BB結合結構域包含根據SEQ ID NO:47之序列。

【0587】在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個4-1BB結合結構域，該4-1BB結合結構域係包含各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區的scFv結構域，其中該V_H及V_L結構域藉由連接子連接。在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個4-1BB結合結構域，該4-1BB結合結構域係包含各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列

具有至少95%一致性之 V_H 及 V_L 區的scFv結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個4-1BB結合結構域，該4-1BB結合結構域係包含各自與表8給出之 V_H 及 V_L 序列具有至少95%一致性之 V_H 及 V_L 區的scFv結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。

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

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YVVFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
SEQ ID NO:47 4-1BBL 可溶性結構域	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYVFFQ LELRRVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQCATVLG LFRVTPEIPA GLPSRSE	60 120 168
SEQ ID NO:48 4B4-1-1版本1 之可變重鏈	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
SEQ ID NO:49 4B4-1-1版本1 之可變輕鏈	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYQCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:50 4B4-1-1版本2 之可變重鏈	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
SEQ ID NO:51 4B4-1-1版本2 之可變輕鏈	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYQCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:52 H39E3-2可變重鏈	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
SEQ ID NO:53 H39E3-2可變輕鏈	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKFGQPP KLLIYYASTR QSGVPRFSG SSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

【0588】在一實施態樣中，4-1BB促效劑係4-1BB促效性單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性4-1BB結合結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性4-1BB結合結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性4-1BB結合結構域，進一步包含在N端及/或C端之額外結構域，且其中該額外結構域係Fab或Fc片段結構域。在一實施態樣中，4-

1BB促效劑係4-1BB促效性單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性4-1BB結合結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性4-1BB結合結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性4-1BB結合結構域，進一步包含在N端及/或C端之額外結構域，其中該額外結構域係Fab或Fc片段結構域，其中該可溶性4-1BB結構域之各者缺乏莖區域(其促成三聚作用且提供距離細胞膜的某些距離，但不是4-1BB結合結構域的一部分)且該第一及第二肽連接子獨立地具有3至8個胺基酸長度。

【0589】在一實施態樣中，4-1BB促效劑係4-1BB促效性單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性腫瘤壞死因子(TNF)超家族細胞介素結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性TNF超家族細胞介素結構域，其中可溶性TNF超家族細胞介素結構域之各者缺乏莖區域且該第一及第二肽連接子獨立地具有3至8個胺基酸長度，且其中各TNF超家族細胞介素結構域係4-1BB結合結構域。

【0590】在一實施態樣中，4-1BB促效劑係4-1BB促效性scFv抗體，其包含任何前述者之V_H結構域連接至任何前述者之V_L結構域。

【0591】在一實施態樣中，4-1BB促效劑係BPS Bioscience的4-1BB促效劑抗體(產品編號79097-2，可購自BPS Bioscience, San Diego, CA, USA)。在一實施態樣中，4-1BB促效劑係Creative Biolabs的4-1BB促效劑抗體(產品編

號 MOM-18179，可購自 Creative Biolabs, Shirley, NY, USA)。

3.OX40 (CD134)促效劑

【0592】在一實施態樣中，TNFRSF促效劑係OX40 (CD134)促效劑。OX40促效劑可為任何所屬技術領域中已知之OX40結合分子。OX40結合分子可為能夠與人或哺乳動物OX40結合之單株抗體或融合蛋白質。OX40促效劑或OX40結合分子可包含免疫球蛋白分子之任何同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類型(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或亞型的免疫球蛋白重鏈。OX40促效劑或OX40結合分子可具有重鏈及輕鏈。如本文中所使用，用語結合分子亦包括抗體(包括全長抗體)、單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、人、人源化或嵌合抗體及抗體片段例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現庫產生的片段、任何上述者之表位結合片段、及抗體之經工程改造形式例如與OX40結合之scFv分子。在一實施態樣中，OX40促效劑係一種全人抗體的抗原結合蛋白質。在一實施態樣中，OX40促效劑係一種人源化抗體的抗原結合蛋白質。在一些實施態樣中，用於本揭示方法及組成物中之OX40促效劑包括抗OX40抗體、人抗OX40抗體、小鼠抗OX40抗體、哺乳動物抗OX40抗體、單株抗OX40抗體、多株抗OX40抗體、嵌合抗OX40抗體、抗OX40粘連蛋白、抗OX40結構域抗體、單鏈抗OX40片段、重鏈抗OX40片段、

輕鏈抗OX40片段、抗OX40融合蛋白質、及彼等之片段、衍生物、接合物、變體、或生物類似物。在一較佳實施態樣中，OX40促效劑係促效性抗OX40人源化或全人類單株抗體(即衍生自單一細胞系之抗體)。

【0593】在一較佳實施態樣中，OX40促效劑或OX40結合分子亦可為融合蛋白質。包含與OX40L融合之Fc結構域的OX40融合蛋白質係描述於例如 Sadun, et al., *J. Immunother.* 2009, 182, 1481-89。在一較佳實施態樣中，相較於一般擁有二個配體結合結構域的促效性單株抗體而言，多聚體OX40促效劑諸如三聚體或六聚體OX40促效劑(具有三個或六個配體結合結構域)可誘導優異的受體(OX40L)叢聚及內部細胞性傳訊複合物形成。包含三個TNFRSF結合結構域及IgG1-Fc且視需要進一步連接二或更多個這些融合蛋白質的三聚體(三價)或六聚體(或六價)或更大融合蛋白質係描述於例如 Gieffers, et al., *Mol. Cancer Therapeutics* 2013, 12, 2735-47中。

【0594】已知促效性OX40抗體及融合蛋白質可誘導強烈免疫反應。Curti, et al., *Cancer Res.* 2013, 73, 7189-98。在一較佳實施態樣中，OX40促效劑係以足以減少毒性之方式與OX40抗原特異性結合的單株抗體或融合蛋白質。在一些實施態樣中，OX40促效劑係廢除抗體依賴性細胞性毒性(ADCC)例如NK細胞細胞毒性之促效性OX40單株抗體或融合蛋白質。在一些實施態樣中，OX40促效劑係廢除抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)之促效性OX40單

株抗體或融合蛋白質。在一些實施態樣中，OX40促效劑係廢除補體依賴性細胞毒性(CDC)之促效性OX40單株抗體或融合蛋白質。在一些實施態樣中，OX40促效劑係廢除Fc區功能性之促效性OX40單株抗體或融合蛋白質。

【0595】在一些實施態樣中，OX40促效劑係由以高親和性及促效性活性與人OX40 (SEQ ID NO:54)結合來表徵。在一實施態樣中，OX40促效劑係與人OX40 (SEQ ID NO:54)結合之結合分子。在一實施態樣中，OX40促效劑係與鼠OX40 (SEQ ID NO:55)結合之結合分子。OX40促效劑或結合分子所結合之OX40抗原的胺基酸序列係總結於表9中。

表9：OX40抗原之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:54	MCVGARLRGR GPCAAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ	60
人 OX40	NTVCRPCGPG FYNDVVSCKP CKPCTWCNLR SGERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK	120
(智人(Homo sapiens))	PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQFASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ	180
	GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL	240
	RRDQRLPPDA HKPPGGGSEF TPIQEEQADA HSTLAKI	277
SEQ ID NO:55	MYVWVQQPTA LLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSEGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC	60
鼠 OX40	HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCPTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG	120
(家鼠(Mus musculus))	VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP	180
	TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPFG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW	240
	RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHETLA KI	272

【0596】在一些實施態樣中，所述之組成物、過程及方法包括以約100 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約90 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約80 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約70 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約60 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約50 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約40 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40或以約30 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40。

OX40之OX40促效劑。

【0597】在一些實施態樣中，所述之組成物、過程及方法包括以約 7.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 7.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 8×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 8.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 9×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 9.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠OX40結合或以約 1×10^6 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠OX40結合之OX40促效劑。

【0598】在一些實施態樣中，所述之組成物、過程及方法包括以約 2×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 2.1×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 2.2×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 2.3×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 2.4×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 2.5×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 2.6×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合或以約 2.7×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 2.8×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合、以約 2.9×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合或以約 3×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠OX40結合之OX40促效劑。

【0599】在一些實施態樣中，所述之組成物、過程及方法包括以約10 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠OX40結合、以

約 9 nM 或較低之 IC₅₀ 與人或鼠 OX40 結合、以約 8 nM 或較低之 IC₅₀ 與人或鼠 OX40 結合、以約 7 nM 或較低之 IC₅₀ 與人或鼠 OX40 結合、以約 6 nM 或較低之 IC₅₀ 與人或鼠 OX40 結合、以約 5 nM 或較低之 IC₅₀ 與人或鼠 OX40 結合、以約 4 nM 或較低之 IC₅₀ 與人或鼠 OX40 結合、以約 3 nM 或較低之 IC₅₀ 與人或鼠 OX40 結合、以約 2 nM 或較低之 IC₅₀ 與人或鼠 OX40 結合或以約 1 nM 或較低之 IC₅₀ 與人或鼠 OX40 結合之 OX40 促效劑。

【0600】在一些實施態樣中，OX40 促效劑係塔伏利西單抗，亦稱為 MEDI0562 或 MEDI-0562。塔伏利西單抗可得自 AstraZeneca, Inc. 的子公司 MedImmune。塔伏利西單抗係免疫球蛋白 G1-κ 抗 [智人 TNFRSF4 (腫瘤壞死因子受體 (TNFR) 超家族成員 4，OX40，CD134)] 人源化及嵌合單株抗體。塔伏利西單抗之胺基酸序列係如表 10 所示。塔伏利西單抗包含位於位置 301 及 301”之 N-醣化位點，附接岩藻糖基化複合物雙觸角 CHO 型聚醣；位於位置 22 至 95 (V_H-V_L)、148 至 204 (C_{H1}-C_L)、265 至 325 (C_{H2}) 及 371 至 429 (C_{H3}) (及位於位置 22”至 95”、148”至 204”、265”至 325”及 371”至 429”) 之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置 23’至 88’ (V_H-V_L) 及 134’至 194’ (C_{H1}-C_L) (及位於位置 23”至 88”及 134”至 194”) 之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於位置 230 至 230”及 233 至 233”之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及位於 224 至 214’及 224”至 214”之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。目前塔伏利西單抗在多種實質腫瘤適應症之臨床試驗包括美國國家衛生研究院

(U.S. National Institutes of Health)clinicaltrials.gov 識別號 NCT02318394 及 NCT02705482。

【0601】在一實施態樣中，OX40 促效劑包含由 SEQ ID NO:56 給出之重鏈及由 SEQ ID NO:57 給出之輕鏈。在一實施態樣中，OX40 促效劑包含分別具有 SEQ ID NO:56 及 SEQ ID NO:57 所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab 片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施態樣中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:56 及 SEQ ID NO:57 所示序列具有至少 99% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:56 及 SEQ ID NO:57 所示序列具有至少 98% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:56 及 SEQ ID NO:57 所示序列具有至少 97% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:56 及 SEQ ID NO:57 所示序列具有至少 96% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:56 及 SEQ ID NO:57 所示序列具有至少 95% 一致性之重鏈及輕鏈。

【0602】在一實施態樣中，OX40 促效劑包含塔伏利西單抗之重鏈及輕鏈 CDR 或可變區 (VR)。在一實施態樣中，OX40 促效劑重鏈可變區 (V_H) 包含 SEQ ID NO:58 所示之序列且 OX40 促效劑輕鏈可變區 (V_L) 包含 SEQ ID NO:59 所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施態樣中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:58 及 SEQ ID

NO:59所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含scFv抗體，該scFv抗體包含各自與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。

【0603】 在一實施態樣中，OX40促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61及SEQ ID NO:62所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64及SEQ ID NO:65所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0604】 在一實施態樣中，OX40促效劑係藥物管理機構參照塔伏利西單抗所核准的OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施態樣中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性(例如97%、98%、99%或100%序列一致性)之胺基酸序列，且其相較於該參

考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品係塔伏利西單抗。在一些實施態樣中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醮化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施態樣中，生物類似物係經核准或申請核准之OX40促效劑抗體，其中該OX40促效劑抗體係提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物，其中該參考藥品或參考生物產品係塔伏利西單抗。OX40促效劑抗體可由藥物管理機構諸如美國FDA及/或歐盟的EMA核准。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係塔伏利西單抗。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係塔伏利西單抗。

表 10：與塔伏利西單抗相關之OX40促效劑抗體的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:56 塔伏利西單抗重鏈	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSS SGYWNWIRKH PGKGLEIYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WQOQTTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKHTHC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMSRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKT SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
SEQ ID NO:57 塔伏利西單抗輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWVK DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	60 120 180 214
SEQ ID NO:58 塔伏利西單抗重鏈可變區	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSS SGYWNWIRKH PGKGLEIYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WQOQTTLVT	60 118
SEQ ID NO:59 塔伏利西單抗輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:60 塔伏利西單抗重鏈CDR1	GSFSSGYWN	9
SEQ ID NO:61 塔伏利西單抗重鏈CDR2	YIGYISYNGI TYH	13
SEQ ID NO:62 塔伏利西單抗重鏈CDR3	RYKYDYDGGH AMDY	14
SEQ ID NO:63 塔伏利西單抗輕鏈CDR1	QDISNYLN	8
SEQ ID NO:64 塔伏利西單抗輕鏈CDR2	LLIYYTSKLN S	11
SEQ ID NO:65 塔伏利西單抗輕鏈CDR3	QQGSALPW	8

【0605】在一些實施態樣中，OX40促效劑係11D4，其係可得自Pfizer, Inc.的全人抗體。11D4之製備及特性係描述於美國專利第7,960,515、8,236,930及9,028,824號，彼等揭露以引用方式併入本文中。11D4之胺基酸序列係如表11所示。

【0606】在一實施態樣中，OX40促效劑包含由SEQ ID NO:66給出之重鏈及由SEQ ID NO:67給出之輕鏈。在一實施態樣中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:66及

SEQ ID NO:67所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列具有至少99%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列具有至少98%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0607】在一實施態樣中，OX40促效劑包含11D4之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施態樣中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:68所示之序列且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:69所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。

在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。

【0608】在一實施態樣中，OX40促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71及SEQ ID NO:72所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74及SEQ ID NO:75所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0609】在一實施態樣中，OX40促效劑係藥物管理機構參照11D4所核准的OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施態樣中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性(例如97%、98%、99%或100%序列一致性)之胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品係11D4。在一些實施態樣中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醮化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施態樣中，生物類似物係經核准或申請核准之OX40促效劑抗體，其中該OX40促效劑抗體係提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物，其中該參考藥品或參考生物產品係11D4。OX40促效

劑抗體可由藥物管理機構諸如美國FDA及/或歐盟的EMA核准。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係11D4。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係11D4。

表 11：與11D4相關之OX40促效劑抗體的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:66 11D4重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFQYWGQ GTLTVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPTVSWN SGALTSQVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPCPPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGfy PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
SEQ ID NO:67 11D4輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGRVIT TCRASQGIS SWLAWYQQKPK EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTRKVEIKRTV AAPSVFIFPPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGENC	60 120 180 214
SEQ ID NO:68 11D4重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFQYWGQ GTLTVTVSS	60 118
SEQ ID NO:69 11D4輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGRVIT TCRASQGIS SWLAWYQQKPK EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTRKVEIK	60 107
SEQ ID NO:70 11D4重鏈CDR1	SYSMN	5
SEQ ID NO:71 11D4重鏈CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
SEQ ID NO:72 11D4重鏈CDR3	ESGWYLFQY	9
SEQ ID NO:73 11D4輕鏈CDR1	RASQGISSWL A	11
SEQ ID NO:74 11D4輕鏈CDR2	AASSLQS	7
SEQ ID NO:75 11D4輕鏈CDR3	QQYNSYPPT	9

【0610】在一些實施態樣中，OX40促效劑係18D8，

其係可得自Pfizer, Inc.的全人抗體。18D8之製備及特性係描述於美國專利第7,960,515、8,236,930及9,028,824號，彼等揭露以引用方式併入本文中。18D8之胺基酸序列係如表12所示。

【0611】 在一實施態樣中，OX40促效劑包含由SEQ ID NO:76給出之重鏈及由SEQ ID NO:77給出之輕鏈。在一實施態樣中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列具有至少99%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列具有至少98%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0612】 在一實施態樣中，OX40促效劑包含18D8之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施態樣中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:78所示之序列且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:79所示之序列

及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。

【0613】 在一實施態樣中，OX40促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81及SEQ ID NO:82所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84及SEQ ID NO:85所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0614】 在一實施態樣中，OX40促效劑係藥物管理機構參照18D8所核准的OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施態樣中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性(例如97%、98%、99%或100%序列一致性)之胺基酸序列，且其相較於該參考藥品

或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品係18D8。在一些實施態樣中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醮化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施態樣中，生物類似物係經核准或申請核准之OX40促效劑抗體，其中該OX40促效劑抗體係提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物，其中該參考藥品或參考生物產品係18D8。OX40促效劑抗體可由藥物管理機構諸如美國FDA及/或歐盟的EMA核准。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係18D8。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係18D8。

表 12：與18D8相關之OX40促效劑抗體的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:76 18D8重鏈	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFFYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VIVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVSVLT VVHQDWLNGK EYCKKVSNGK LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:77 18D8輕鏈	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRTATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYERHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
SEQ ID NO:78 18D8重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFFYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
SEQ ID NO:79 18D8輕鏈可變區	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRTATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
SEQ ID NO:80 18D8重鏈CDR1	DYAMH	5
SEQ ID NO:81 18D8重鏈CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
SEQ ID NO:82 18D8重鏈CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
SEQ ID NO:83 18D8輕鏈CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:84 18D8輕鏈CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:85 18D8輕鏈CDR3	QQRSNWPT	8

【0615】在一些實施態樣中，OX40促效劑係Hu119-122，其係可得自GlaxoSmithKline plc.的人源化抗體。Hu119-122之製備及特性係描述於美國專利第9,006,399及9,163,085號及國際專利公開號WO 2012/027328號，彼等揭露以引用方式併入本文中。Hu119-122之胺基酸序列係如表13所示。

【0616】在一實施態樣中，OX40促效劑包含Hu119-122之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施態樣中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:86所示之序列且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:87所示之

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

【0617】在一實施態樣中，OX40促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92及SEQ ID NO:93所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0618】在一實施態樣中，OX40促效劑係藥物管理機構參照Hu119-122所核准的OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施態樣中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性(例如97%、98%、99%或100%序列一致性)之胺基酸序列，且其相較於該參考藥

品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品係 Hu119-122。在一些實施態樣中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醯化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施態樣中，生物類似物係經核准或申請核准之 OX40 促效劑抗體，其中該 OX40 促效劑抗體係提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物，其中該參考藥品或參考生物產品係 Hu119-122。OX40 促效劑抗體可由藥物管理機構諸如美國 FDA 及 / 或歐盟的 EMA 核准。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係 Hu119-122。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係 Hu119-122。

表 13：與Hu119-122相關之OX40促效劑抗體的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:86 Hu119-122 重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNRKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVSS 120
SEQ ID NO:87 Hu119-122 輕鏈可變區	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QOKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVFARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:88 Hu119-122重鏈CDR1	SHDMS 5
SEQ ID NO:89 Hu119-122重鏈CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER 17
SEQ ID NO:90 Hu119-122重鏈CDR3	HYDDYYAWFA Y 11
SEQ ID NO:91 Hu119-122輕鏈CDR1	RASKSVSTSG YSYMH 15
SEQ ID NO:92 Hu119-122輕鏈CDR2	LASNLES 7
SEQ ID NO:93 Hu119-122輕鏈CDR3	QHSRELPLT 9

【0619】在一些實施態樣中，OX40促效劑係Hu106-222，其係可得自GlaxoSmithKline plc.的人源化抗體。Hu106-222之製備及特性係描述於美國專利第9,006,399及9,163,085號及國際專利公開號WO 2012/027328號，彼等揭露以引用方式併入本文中。Hu106-222之胺基酸序列係如表14所示。

【0620】在一實施態樣中，OX40促效劑包含Hu106-222之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施態樣中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:94所示之序列且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:95所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施態樣中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:94及SEQ ID NO:95所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實

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

【0621】在一實施態樣中，OX40促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100及SEQ ID NO:101所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0622】在一實施態樣中，OX40促效劑係藥物管理機構參照Hu106-222所核准的OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施態樣中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性(例如97%、98%、99%或100%序列一致性)之胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品係Hu106-222。在一些實施態樣中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醯化、氧

化、脫醯胺及截短。在一些實施態樣中，生物類似物係經核准或申請核准之OX40促效劑抗體，其中該OX40促效劑抗體係提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物，其中該參考藥品或參考生物產品係Hu106-222。OX40促效劑抗體可由藥物管理機構諸如美國FDA及/或歐盟的EMA核准。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係Hu106-222。在一些實施態樣中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品係Hu106-222。

表 14：與Hu106-222相關之OX40促效劑抗體的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:94 Hu106-222 重鏈可變區	QVQLVQSGSE LKKFGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVROA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTISVSTAY LQISLKAED TAVYVCANPY YDVSYYAMD YWGQTTVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:95 Hu106-222 輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKPK GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTEFGQ GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:96 Hu106-222重鏈CDR1	DYSMH	5
SEQ ID NO:97 Hu106-222重鏈CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
SEQ ID NO:98 Hu106-222重鏈CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
SEQ ID NO:99 Hu106-222輕鏈CDR1	KASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO:100 Hu106-222輕鏈CDR2	SASYLYT	7
SEQ ID NO:101 Hu106-222輕鏈CDR3	QQHYSTPRT	9

【 0623 】 在一些實施態樣中，OX40促效劑抗體係

MEDI6469(又稱為9B12)。MEDI6469係鼠單株抗體。Weinberg, et al., J. Immunother.2006, 29, 575-585。在一些實施態樣中，OX40促效劑係由9B12融合瘤產生之抗體(由Biovest Inc. (Malvern, MA, USA)寄存)，其描述於Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575-585，其揭露全文特此以引用方式併入本文中。在一些實施態樣中，抗體包含MEDI6469之CDR序列。在一些實施態樣中，抗體包含MEDI6469之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。

【0624】在一實施態樣中，OX40促效劑係L106 BD (Pharmingen Product #340420)。在一些實施態樣中，OX40促效劑包含抗體L106 (BD Pharmingen Product #340420)之CDR。在一些實施態樣中，OX40促效劑包含抗體L106 (BD Pharmingen Product #340420)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一實施態樣中，OX40促效劑係ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catalog #20073)。在一些實施態樣中，OX40促效劑包含抗體ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catalog #20073)之CDR。在一些實施態樣中，OX40促效劑包含抗體ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catalog #20073)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一實施態樣中，OX40促效劑係鼠單株抗體抗mCD134/mOX40(克隆OX86)，其可購自InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NH。

【0625】在一實施態樣中，OX40促效劑係選自描述於國際專利申請公開案號WO 95/12673、WO 95/21925、

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

【0626】在一實施態樣中，OX40促效劑係如結構I-A(C端Fc-抗體片段融合蛋白質)或結構I-B(N端Fc-抗體片段融合蛋白質)所描繪之OX40促效性融合蛋白質、或彼等之片段、衍生物、接合物、變體或生物類似物。結構I-A及I-B之特性係描述於以上及美國專利第9,359,420、9,340,599、8,921,519及8,450,460號，彼等揭露以引用方式併入本文中。結構I-A之多肽結構域之胺基酸序列係在表6中給出。Fc結構域較佳地包含完整恆定結構域(SEQ ID NO:31之胺基酸17至230)、完整絞鏈結構域(SEQ ID NO:31之胺基酸1至16)或絞鏈結構域之一部分(例如SEQ ID NO:31之胺基酸4至16)。用於連接C端Fc抗體之較佳連接子可選自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:41給出之實施態樣，包括適用於融合額外多肽之連接子。類似地，結構I-B之多肽結構域之胺基酸序列係在表7中給出。如果Fc抗體片段如結構I-B中融合至TNRFSF融合蛋白質的N端，則Fc模組的序列較佳地顯示於SEQ ID NO:42，且連接子序列較佳地選自如SEQ ID

NO:43至SEQ ID NO:45所示之該些實施態樣。

【0627】在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個選自由下列所組成之群組的OX40結合結構域：塔伏利西單抗之可變重鏈及可變輕鏈、11D4之可變重鏈及可變輕鏈、18D8之可變重鏈及可變輕鏈、Hu119-122之可變重鏈及可變輕鏈、Hu106-222之可變重鏈及可變輕鏈、選自表15所述之可變重鏈及可變輕鏈的可變重鏈及可變輕鏈、前述可變重鏈及可變輕鏈之任何組合、及彼等之片段、衍生物、接合物、變體及生物類似物。

【0628】在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合結構域，該OX40結合結構域包含OX40L序列。在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合結構域，該OX40結合結構域包含根據SEQ ID NO:102之序列。在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合結構域，該OX40結合結構域包含可溶性OX40L序列。在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合結構域，該OX40結合結構域包含根據SEQ ID NO:103之序列。在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合結構域，該OX40結合結構域包含根據SEQ ID NO:104之序列。

【0629】在一實施態樣中，根據結構I-A或I-B之OX40

促效劑融合蛋白質包含一或多個 OX40 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:58 及 SEQ ID NO:59 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施態樣中，根據結構 I-A 或 I-B 之 OX40 促效劑融合蛋白質包含一或多個 OX40 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:68 及 SEQ ID NO:69 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施態樣中，根據結構 I-A 或 I-B 之 OX40 促效劑融合蛋白質包含一或多個 OX40 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:78 及 SEQ ID NO:79 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施態樣中，根據結構 I-A 或 I-B 之 OX40 促效劑融合蛋白質包含一或多個 OX40 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:86 及 SEQ ID NO:87 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施態樣中，根據結構 I-A 或 I-B 之 OX40 促效劑融合蛋白質包含一或多個 OX40 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:94 及 SEQ ID NO:95 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施態樣中，根據結構 I-A 或 I-B 之 OX40 促效劑融合蛋白質包含一或多個 OX40 結合結構域，該 OX40 結合

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

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

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	60 120 180 183
SEQ ID NO:103 OX40L可溶性結構域	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNNS VIINCDGFYL ISLKGYSQSE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
SEQ ID NO:104 OX40L可溶性 結構域(替代性)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNNSVII NCDGFYLLISL KGYSQSEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDRVYLNVT DNTSLDDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
SEQ ID NO:105 008可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGLTVTVS	60 120
SEQ ID NO:106 008可變輕鏈	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLI HSNNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYYNHP TTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:107 011可變重鏈	EVQLVESGGG VVQPRGSLRL SCAASGFTFS DYTMMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGSGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAPFDYWG QGTLVTVSSA	60 120
SEQ ID NO:108 011可變輕鏈	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLI HSNNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYYNHP TTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:109 021可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPLNADY WGQGLTVTVS	60 120
SEQ ID NO:110 021可變輕鏈	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLI HSNNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYYKSNP PTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:111 023可變重鏈	EVQLVESGGG LVHPPGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA ICTGGGTYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFIDYWG QGTLVTVSS	60 120
SEQ ID NO:112 023可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISLLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:113 重鏈可變區	EVQLQSGGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTYK NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANY YGSSLSMDYWG QGTSVTVSS	60 119
SEQ ID NO:114 輕鏈可變區	DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSSLHSGVPS RFGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWFVFG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:115 重鏈可變區	EVQLQSGGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMMHWKQS HGKSLIEWIGY IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGACTTVTVS P	60 120 121
SEQ ID NO:116 輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVDP RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPVTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:117 人源化抗體之 重鏈可變區	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLIKNE D TATYFCANPY YDYVSYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:118 人源化抗體之 重鏈可變區	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWQGTIVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:119 人源化抗體之 輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFVG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:120 人源化抗體之 輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFVG GTKLEIK	60 107

SEQ ID NO:121 人源化抗體之 重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGLTLTVSA	60 120
SEQ ID NO:122 人源化抗體之 重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVSS	60 120
SEQ ID NO:123 人源化抗體之 輕鏈可變區	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVVEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
SEQ ID NO:124 人源化抗體之 輕鏈可變區	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:125 重鏈可變區	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFFSD AAMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGG GTTLTVSS	60 120 138
SEQ ID NO:126 輕鏈可變區	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGKQVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFGSGSGGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLITFGAG TKLELK	60 120 126

【0630】在一實施態樣中，OX40促效劑係OX40促效性單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性OX40結合結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性OX40結合結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性OX40結合結構域，進一步包含在N端及/或C端之額外結構域，且其中該額外結構域係Fab或Fc片段結構域。在一實施態樣中，OX40促效劑係OX40促效性單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性OX40結合結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性OX40結合結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性OX40結合結構域，進一步包含在N端及/或C端之額外結構域，其中該額外結構域係Fab或Fc片段結構域，其中該可溶性OX40結合結構域之各者缺乏莖區域(其促成三聚作用且提供距離細胞膜的某些距離，但不是OX40結合結構域的一部分)且該第一及第二肽連接子獨立地具有3至8個胺基酸長度。

【0631】在一實施態樣中，OX40促效劑係OX40促效性單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性腫瘤壞死因子(TNF)超家族細胞介素結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性TNF超家族細胞介素結構域，其中可溶性TNF超家族細胞介素結構域之各者缺乏莖區域且該第一及第二肽連接子獨立地具有3至8個胺基酸長度，且其中TNF超家族細胞介素結構域係OX40結合結構域。

【0632】在一些實施態樣中，OX40促效劑係MEDI6383。MEDI6383係OX40促效性融合蛋白質且可如美國專利第6,312,700號所述製備，其揭露以引用方式併入本文中。

【0633】在一實施態樣中，OX40促效劑係OX40促效性scFv抗體，其包含任何前述者之V_H結構域連接至任何前述者之V_L結構域。

【0634】在一實施態樣中，OX40促效劑係Creative Biolabs的OX40促效劑單株抗體MOM-18455，可購自Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, USA。

【0635】在一實施態樣中，OX40促效劑係OX40促效性抗體克隆Ber-ACT35，可購自BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA。

H. 可選的細胞存活性分析

【0636】視需要，在第一擴增步驟B之後可使用所屬技術領域中已知之標準測定執行細胞存活性測定。視需

要，在第一擴增(有時稱為初始主體擴增)之後可使用所屬技術領域中已知之標準測定執行細胞存活性測定。例如，可在主體 TIL 的樣本上進行台盼藍排除測定，其選擇性標示死亡細胞且允許存活性評估。其他用於測試存活性之測定可包括但不限於阿爾瑪藍測定及 MTT 測定。

1. 細胞計數、存活性、流動式細胞測量術

【0637】在一些實施態樣中，測量細胞計數及/或存活性。標誌之表現(諸如但不限於 CD3、CD4、CD8 及 CD56 以及任何其他本文揭示或描述者)可藉由流動式細胞測量術，使用 FACSCanto™ 流動式細胞測量儀(BD Biosciences)以抗體(例如但不限於該些可購自 BD Bio-sciences (BD Biosciences, San Jose, CA)者)測量。細胞可使用拋棄式 c-晶片血球計(VWR, Batavia, IL)手動計數且存活性可使用任何所屬技術領域中已知之方法包括但不限於台盼藍染色評估。

【0638】在一些情況下，主體 TIL 族群可使用以下討論之規程立即冷凍保存。替代地，主體 TIL 族群可如以下討論進行 REP 且接著冷凍保存。類似地，在其中基因修飾的 TIL 將用於療法中的情況中，主體或 REP TIL 族群可經受基因修飾以用於合適治療。

2. 細胞培養

【0639】在一實施態樣中，用於擴增 TIL 之方法可包

括使用約5,000 mL至約25,000 mL的細胞介質、約5,000 mL至約10,000 mL的細胞介質或約5,800 mL至約8,700 mL的細胞介質。在一實施態樣中，擴增TIL數量使用不超過一種細胞培養基。可使用任何合適的細胞培養基，例如AIM-V細胞介質(L-麩醯胺酸、50 μ M鏈黴素硫酸鹽及10 μ M硫酸建它黴素)細胞培養基(Invitrogen, Carlsbad CA)。就此而言，本發明方法有利地減少擴增TIL數量所需的介質的量及介質類型的數量。在一實施態樣中，擴增TIL數量可包含頻繁性不超過每三或四天一次地添加新鮮細胞培養基至細胞(亦稱為餵養細胞)。在氣體可通透容器中擴增細胞數量藉由減少擴增細胞所需的餵養頻率，簡化擴增細胞數量所需之程序。

【0640】 在一實施態樣中，在第一及/或第二氣體可通透容器中之細胞介質係未經過濾。使用未經過濾細胞介質可簡化擴增細胞數量所需的程序。在一實施態樣中，在第一及/或第二氣體可通透容器中之細胞介質缺乏 β -巰乙醇(BME)。

【0641】 在一實施態樣中，該方法的期間包含自哺乳動物獲得腫瘤組織樣本；在其中含有細胞介質之第一氣體可通透容器中培養腫瘤組織樣本；自腫瘤組織樣本獲得TIL；在其中含有細胞介質之第二氣體可通透容器中使用aAPC擴增TIL數量一段約14至約42天例如約28天的期間。

【0642】 在一實施態樣中，TIL係在氣體可通透容器中擴增。已使用氣體可通透容器來擴增TIL，且使用

PBMC、使用所屬技術領域中已知之方法、組成物及裝置，包括該些描述於美國專利申請公開案第2005/0106717 A1號者，其揭露以引用方式併入本文中。在一實施態樣中，TIL係在氣體可通透袋子中擴增。在一實施態樣中，TIL使用在氣體可通透袋子中擴增TIL的細胞擴增系統擴增，諸如Xuri細胞擴增系統W25 (GE Healthcare)。在一實施態樣中，TIL使用在氣體可通透袋子中擴增TIL的細胞擴增系統擴增，諸如WAVE生物反應器系統，亦稱為Xuri細胞擴增系統W5 (GE Healthcare)。在一實施態樣中，細胞擴增系統包括氣體可通透細胞袋子，該袋子的體積選自由約100 mL、約200 mL、約300 mL、約400 mL、約500 mL、約600 mL、約700 mL、約800 mL、約900 mL、約1 L、約2 L、約3 L、約4 L、約5 L、約6 L、約7 L、約8 L、約9 L及約10 L所組成之群組。

【0643】在一實施態樣中，TIL可在G-Rex培養瓶(可購自Wilson Wolf Manufacturing)中擴增。該等實施態樣允許細胞族群自約 5×10^5 細胞/cm²擴增至介於 10×10^6 與 30×10^6 細胞/cm²之間。在一實施態樣中，此擴增係於不添加新鮮細胞培養基至細胞(亦稱為餵養細胞)下進行。在一實施態樣中，此係未進行餵養，只要G-Rex培養瓶中的介質位在約10 cm的高度。在一實施態樣中，不進行餵養，但添加一或多種細胞介素。在一實施態樣中，細胞介素可為作為推注添加，不需要將細胞介素與介質混合。該等容器、裝置及方法係所屬技術領域中已知且已用於擴增TIL，且包

括該些描述於美國專利申請公開案第US 2014/0377739A1號、國際專利公開號WO 2014/210036 A1、美國專利申請公開案第 us 2013/0115617 A1號、國際專利公開號WO 2013/188427 A1、美國專利申請公開案第US 2011/0136228 A1號、美國專利第US 8,809,050 B2號、國際專利公開號WO 2011/072088 A2、美國專利申請公開案第US 2016/0208216 A1號、美國專利申請公開案第US 2012/0244133 A1號、國際專利公開號WO 2012/129201 A1、美國專利申請公開案第US 2013/0102075 A1號、美國專利第US 8,956,860 B2號、國際專利公開號WO 2013/173835 A1、美國專利申請公開案第US 2015/0175966 A1號，彼等揭露以引用方式併入本文中。該等過程亦描述於Jin et al., *J. Immunotherapy*, 2012, 35:283-292。

I. 可選的TIL基因工程改造

【0644】在一些實施態樣中，TIL視需要經基因工程改造以包括額外功能性，包括但不限於高親和性T細胞受體(TCR)，例如靶向腫瘤相關抗原(諸如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)之TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子(例如間皮素)或細胞系限制細胞表面分子(例如CD19)結合之嵌合抗原受體(CAR)。

J. 可選的TIL冷凍保存

【0645】如上所討論且例示於如圖8中提供的步驟A至

E, 冷凍保存可發生在TIL擴增過程中的許多時點。在一些實施態樣中, 在第二擴增(例如根據圖8步驟D所提供)後的經擴增TIL族群可經冷凍保存。冷凍保存通常可藉由將TIL族群放入冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲亞砜(DMSO))中完成。將細胞溶液放入冷凍小瓶中且儲存在-80°C下24小時, 可選的轉移至氣態氮冷凍器中冷凍保存。見Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986。在一些實施態樣中, TIL係冷凍保存於5% DMSO中。在一些實施態樣中, TIL係冷凍保存於細胞培養基加5% DMSO中。在一些實施態樣中, TIL係根據實例8及9所提供之方法冷凍保存。

【0646】當適當時, 將細胞自冷凍器移出並在37°C水浴中解凍, 直到大約4/5的溶液解凍。將細胞大致上重懸於完全介質中且視需要洗滌一或多次。在一些實施態樣中, 解凍的TIL可經計數且依所屬技術領域中已知之方式評估存活性。

K.用於表型表徵擴增TIL之方法

【0647】顆粒溶解酶B產生: 顆粒溶解酶B是TIL殺死目標細胞的能力的另一種測量。如上述使用抗CD3、CD28及CD137/4-1BB之抗體再刺激之介質上清液的顆粒溶解酶B水準亦根據廠商指示使用人顆粒溶解酶B DuoSet ELISA套組(R & D Systems, Minneapolis, MN)評估。在一些實施態樣中, 第二擴增TIL或第二額外擴增TIL(諸如例如該些

於圖8步驟D中描述者，包括稱為reREP TIL之TIL)具有增加的顆粒溶解酶B產生。

【0648】 在一些實施態樣中，端粒長度可用來作為細胞存活性及/或細胞性功能的測量。在一些實施態樣中，在本發明所生產之TIL中的端粒相較於使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8中體現之方法以外的方法)製備的TIL意外地具有相同長度。端粒長度測量：多種方法已用於測量基因體DNA及細胞學製劑的端粒長度。端粒限制片段(TRF)分析是測量端粒長度的黃金標準(de Lange et al., 1990)。然而，TRF的重大限制在於需要大量DNA (1.5 μ g)。二種廣泛用於測量端粒長度的方法，也就是螢光原位雜交(FISH; Agilent Technologies, Santa Clara, CA)及定量PCR可為本發明所採用。

【0649】 在一些實施態樣中，TIL健康係藉由IFN- γ 分泌測量。在一些實施態樣中，IFN- γ 分泌指示活性TIL。在一些實施態樣中，採用IFN- γ 產生的效力測定。IFN- γ 產生是細胞毒性潛力的另一種測量。IFN- γ 產生可藉由判定經抗CD3、CD28及CD137/4-1BB之抗體刺激的TIL介質中的細胞介素IFN- γ 水準來測量。來自這些受刺激TIL之介質中的IFN- γ 水準可使用測量IFN- γ 釋放來判定。

【0650】 在一些實施態樣中，根據TIL測定的生物發光重定向裂解測定(效力測定)，使用TIL與生物發光細胞系P815(殖株G6)之共培養測定來評估TIL裂解目標細胞的細胞毒性潛力，其以高度敏感劑量依賴性方式測量TIL細

胞毒性。

【0651】 在一些實施態樣中，本方法提供使用上述方法用於評估TIL存活性的測定。在一些實施態樣中，TIL的擴增如上所討論，包括例如圖8所提供者。在一些實施態樣中，TIL在評估存活性之前經冷凍保存。在一些實施態樣中，存活性評估包括在執行第一擴增、第二擴增及額外第二擴增之前解凍TIL。在一些實施態樣中，本方法提供用於評估細胞增生、細胞毒性、細胞死亡及/或其他與TIL族群存活性有關之用語的測定。存活性可藉由任何上述之TIL代謝測定以及任何所屬技術領域中已知用於評估細胞存活性之方法來測量。在一些實施態樣中，本方法提供用於評估細胞增生、細胞毒性、細胞死亡及/或其他與使用本文所述之方法(包括該些例示於圖8者)擴增之TIL的存活性有關之用語的測定。

【0652】 本發明亦提供用於判定TIL存活性之測定方法。在一些實施態樣中，TIL相較於新鮮收集TIL及/或使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8中體現之方法以外的方法)製備的TIL具有相等的存活性。在一些實施態樣中，TIL相較於新鮮收集TIL及/或使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8中體現之方法以外的方法)製備的TIL具有增加的存活性。本揭露提供藉由擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成為較大TIL族群而用於測定TIL存活性之方法，其包含：

(i) 獲得先前已擴增之第一TIL族群；

(ii) 執行第一擴增，其藉由在包含 IL-2 及視需要 OKT-3 之細胞培養基中培養第一 TIL 族群，以產生第二 TIL 族群；及

(iii) 藉由用額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 補充該第二 TIL 族群之細胞培養基來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群於數量上高於該第二 TIL 族群至少 100 倍，且其中該第二擴增執行至少 14 天以獲得該第三 TIL 族群，且其中進一步測定該第三 TIL 族群存活性。

【0653】 在一些實施態樣中，方法進一步包含：

(iv) 藉由用額外的 IL-2、額外的 OKT-3 及額外的 APC 補充該第三 TIL 族群之細胞培養基來執行額外第二擴增，其中該額外第二擴增執行至少 14 天以獲得比起步驟 (iii) 所獲得者較大的 TIL 族群，且其中進一步測定該第三族群存活性。

【0654】 在一些實施態樣中，在步驟 (i) 之前，細胞係經冷凍保存。

【0655】 在一些實施態樣中，細胞在執行步驟 (i) 之前解凍。

【0656】 在一些實施態樣中，重複步驟 (iv) 一至四次以獲得足夠的 TIL 以供分析。

【0657】 在一些實施態樣中，步驟 (i) 至 (iii) 或 (iv) 在一段約 40 天至約 50 天的期間之內執行。

【0658】 在一些實施態樣中，步驟 (i) 至 (iii) 或 (iv) 在

一段約42天至約48天的期間之內執行。

【0659】在一些實施態樣中，步驟(i)至(iii)或(iv)在一段約42天至約45天的期間之內執行。

【0660】在一些實施態樣中，步驟(i)至(iii)或(iv)在約44天之內執行。

【0661】在一些實施態樣中，來自步驟(iii)或(iv)之細胞以類似於新鮮收集的細胞的水準表現CD4、CD8及TCR $\alpha\beta$ 。

【0662】在一些實施態樣中，抗原呈現細胞係周邊血液單核細胞(PBMC)。

【0663】在一些實施態樣中，PBMC係於步驟(iii)之第9至17天中任一天添加至細胞培養。

【0664】在一些實施態樣中，APC係人工APC (aAPC)。

【0665】在一些實施態樣中，方法進一步包含用包含編碼高親和性T細胞受體之核酸之表現載體轉導第一TIL族群之步驟。

【0666】在一些實施態樣中，轉導步驟發生在步驟(i)之前。

【0667】在一些實施態樣中，方法進一步包含用包含編碼嵌合抗原受體(CAR)之核酸之表現載體轉導第一TIL族群之步驟，該嵌合抗原受體包含與T細胞傳訊分子之至少一個胞內域融合之單鏈可變片段抗體。

【0668】在一些實施態樣中，轉導步驟發生在步驟(i)之前。

【0669】 在一些實施態樣中，測定TIL存活性。

【0670】 在一些實施態樣中，在冷凍保存後測定TIL存活性。

【0671】 在一些實施態樣中，在冷凍保存後及在步驟(iv)後測定TIL存活性。

【0672】 T及B淋巴球的多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段的體細胞重組產生。這些基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)的結合特異性及下游應用。本發明提供產製展現及增加T細胞貯庫多樣性(有時稱為多株性)之TIL的方法。在一些實施態樣中，T細胞貯庫多樣性的增加係相較於新鮮收集TIL及/或使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8中體現之方法以外的方法)製備的TIL具有增加的存活性。在一些實施態樣中，藉由本方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施態樣中，在第一擴增獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施態樣中，增加多樣性是增加免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施態樣中，多樣性存在免疫球蛋白中、存在免疫球蛋白重鏈中。在一些實施態樣中，多樣性存在免疫球蛋白中、存在免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施態樣中，多樣性存在T細胞受體中。在一些實施態樣中，多樣性存在選自由 α 、 β 、 γ 及 δ 受體所組成之群組的T細胞受體中之一者中。在一些實施態樣中，T細胞受體(TCR) α 及/或 β 的表現增加。在一些實施態

樣中，T細胞受體(TCR) α 的表現增加。在一些實施態樣中，T細胞受體(TCR) β 的表現增加。在一些實施態樣中，TCRab(即TCR α/β)的表現增加。

【0673】根據本揭露，一種用於測定TIL存活性及/或投予至個體之進一步用途的方法。在一些實施態樣中，用於測定腫瘤浸潤淋巴球(TIL)之方法包含：

(i) 獲得第一TIL族群；

(ii) 執行第一擴增，其藉由在包含IL-2及視需要OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL族群，以產生第二TIL族群；及

(iii) 執行第二擴增，其藉由將第二TIL族群的細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以產生第三TIL族群，其中該第三TIL族群於數量上高於第二TIL族群至少50倍；

(iv) 收集、洗滌及冷凍保存第三TIL族群；

(v) 儲存冷凍保存TIL在冷凍溫度下；

(vi) 解凍第三TIL族群以提供解凍的第三TIL族群；

及

(vii) 執行一部分解凍的第三TIL族群的額外第二擴增，其藉由將第三族群的細胞培養基補充IL-2、OKT-3及APC一段至少3天的額外擴增期間(有時稱為reREP期間)，其中執行第三擴增以獲得第四TIL族群，其中比較第四TIL族群中的TIL數量與第三TIL族群中的TIL數量以獲得比例；

(viii) 基於步驟(vii)中的比例判定解凍的TIL族群是否適用於投予至患者；

(ix) 當步驟(viii)中之第四TIL族群中的TIL數量對第三TIL族群中的TIL數量之比例判定為大於5:1，投予治療有效劑量的解凍的第三TIL族群至患者。

【0674】 在一些實施態樣中，額外擴增期間(有時稱為reREP期間)係執行直到第四TIL族群中的TIL數量對第三TIL族群中的TIL數量之比例大於50:1。

【0675】 在一些實施態樣中，對治療有效劑量而言足夠的TIL數量係約 2.3×10^{10} 至約 13.7×10^{10} 個。

【0676】 在一些實施態樣中，步驟(i)至(vii)在一段約40天至約50天的期間之內執行。在一些實施態樣中，步驟(i)至(vii)在一段約42天至約48天的期間之內執行。在一些實施態樣中，步驟(i)至(vii)在一段約42天至約45天的期間之內執行。在一些實施態樣中，步驟(i)至(vii)在約44天之內執行。

【0677】 在一些實施態樣中，來自步驟(iii)或(vii)之該等細胞以類似於新鮮收集的細胞的水準表現CD4、CD8及TCR $\alpha \beta$ 。在一些實施態樣中，細胞是TIL。

【0678】 在一些實施態樣中，抗原呈現細胞係周邊血液單核細胞(PBMC)。在一些實施態樣中，PBMC係於步驟(iii)之第9至17天中任一天添加至細胞培養。

【0679】 在一些實施態樣中，APC係人工APC (aAPC)。

【0680】 在一些實施態樣中，轉導第一TIL族群之步

驟用包含編碼高親和性T細胞受體之核酸之表現載體進行。

【0681】在一些實施態樣中，轉導步驟發生在步驟(i)之前。

【0682】在一些實施態樣中，轉導第一TIL族群之步驟用包含編碼嵌合抗原受體(CAR)之核酸之表現載體進行，該嵌合抗原受體包含與T細胞傳訊分子之至少一個胞內域融合之單鏈可變片段抗體。

【0683】在一些實施態樣中，轉導步驟發生在步驟(i)之前。

【0684】在一些實施態樣中，在步驟(vii)後測定TIL存活性。

【0685】本揭露亦提供測定TIL之進一步方法。在一些實施態樣中，本揭露提供一種測定TIL之方法，其包含：

- (i) 獲得一部分的第一冷凍保存TIL族群；
- (ii) 將該部分的第一冷凍保存TIL族群解凍；
- (iii) 執行第一擴增，其藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養該部分的第一TIL族群一段至少3天的額外擴增期間(有時稱為reREP期間)以產生第二TIL族群，其中比較來自第一TIL族群的該部分與第二TIL族群以獲得TIL數量的比例，其中第二TIL族群中的TIL數量對第一TIL族群的該部分中的TIL數量的比例係大於5:1；

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

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

【0686】 在一些實施態樣中，第二 TIL 族群中的 TIL 數量對第一 TIL 族群的該部分中的 TIL 數量之比例係大於 50:1。

【0687】 在一些實施態樣中，該方法進一步包含根據本文提供之任何實施態樣所述之方法，執行來自步驟(i)之整個第一冷凍保存 TIL 族群的擴增。

【0688】 在一些實施態樣中，該方法進一步包含投予來自步驟(i)之整個第一冷凍保存 TIL 族群至患者。

L. 用於 TIL 製造的密閉系統

【0689】 本發明提供在 TIL 培養過程期間使用密閉系統。該等密閉系統允許預防及/或減少微生物污染、允許使用較少培養瓶且允許成本降低。在一些實施態樣中，密閉系統使用二個容器。

【0690】 該等密閉系統係所屬技術領域中廣為周知且可見於例如 <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> 及 <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>。

【0691】 在一些實施態樣中，密閉系統包括例如實例

16所述之魯爾鎖及熱封系統。在一些實施態樣中，密閉系統係在無菌條件下經由針筒進入以維持系統的無菌性及密閉特性。在一些實施態樣中，採用如實例 16所述的密閉系統。在一些實施態樣中，將 TIL 根據實例 16 第 8.14 節「最終調配及填充」所述之方法調配到最終產物調配物容器中。

【0692】 如 FDA 網站上所提供，使用無菌方法的密閉系統係已知且廣為描述。見

<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>，如上參照且提供於以下相關部分。

介紹

【0693】 無菌連接裝置 (STCD) 在二件可相容管之間產生無菌接合。此程序允許無菌連接多種容器及管直徑。此指南描述使用這些裝置的建議作業及程序。此指南並不涉及無菌連接裝置廠商必須提交給 FDA 以獲得核准或上市許可證的資料或資訊。也很重要的是應注意，使用經核准或許可的無菌連接裝置於非標示核准之目的，可造成該裝置依據聯邦食品、藥品及化妝品法 (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act) 被視為攙假及不實標示。

【0694】 在一些實施態樣中，密閉系統從獲得腫瘤片段之時開始一直到準備將 TIL 投予至患者或冷凍保存為止，僅使用一個容器。在一些使用二個容器之實施態樣

中，第一容器係密閉G容器，且TIL族群在無需打開第一密閉G容器下離心及轉移至輸注袋。在一些使用二個容器之實施態樣中，輸注袋係含有HypoThermosol之輸注袋。密閉系統或密閉TIL細胞培養系統的特徵在於，一旦添加了腫瘤樣本及/或腫瘤片段，該系統即可從外面緊密封以形成密閉環境，不受細菌、真菌及/或任何其他微生物污染入侵。

【0695】在一些實施態樣中，微生物污染減少介於約5%與約100%之間。在一些實施態樣中，微生物污染減少介於約5%與約95%之間。在一些實施態樣中，微生物污染減少介於約5%與約90%之間。在一些實施態樣中，微生物污染減少介於約10%與約90%之間。在一些實施態樣中，微生物污染減少介於約15%與約85%之間。在一些實施態樣中，微生物污染減少約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%或約100%。

【0696】密閉系統允許TIL在無微生物污染存在下及/或在微生物污染顯著減少下生長。

【0697】再者，TIL細胞培養環境的pH、二氧化碳分壓及氧分壓各隨細胞培養而異。因此，即使適用於細胞培養之介質係經循環，該密閉環境仍需要持續維持為適合TIL增生的最佳環境。為達此目的，所欲的是藉由感測器

監測密閉環境的培養液體內之 pH、二氧化碳分壓及氧分壓物理因子，其信號用於控制安裝在培養環境入口的氣體交換器，且密閉環境的氣體分壓根據培養液體中的變化即時調整，以最佳化細胞培養環境。在一些實施態樣中，本發明提供密閉細胞培養系統，其在到密閉系統的入口處包含配備有監測裝置的氣體交換器，該監測裝置測量該密閉環境的 pH、二氧化碳分壓及氧分壓，且藉由基於來自該監測裝置的信號自動調整氣體濃度來最佳化細胞培養環境。

【0698】 在一些實施態樣中，在密閉環境中的壓力係經連續或間歇控制。也就是說，在密閉環境中的壓力可藉由例如壓力維持裝置而異，因此確保空間適合 TIL 在正壓狀態下生長，或促進流體在負壓狀態下滲出且因此促進細胞增生。再者藉由間歇性施加負壓，有可能藉由暫時性收縮密閉環境的體積而一致地且有效地置換在密閉環境中循環的液體。

【0699】 在一些實施態樣中，用於 TIL 增生的最佳培養組分可經取代或添加，且可添加包括諸如 IL-2 及 / 或 OKT3 的因子以及組合。

C. 細胞培養

【0700】 在一實施態樣中，用於擴增 TIL 之方法(包括該些以上討論以及圖 8 例示者)可包括使用約 5,000 mL 至約 25,000 mL 的細胞介質、約 5,000 mL 至約 10,000 mL 的細胞介質或約 5,800 mL 至約 8,700 mL 的細胞介質。在一些實施

態樣中，介質係不含血清介質，如例如實例21中所述。在一些實施態樣中，在第一擴增中之介質係不含血清。在一些實施態樣中，在第二擴增中之介質係不含血清。在一些實施態樣中，在第一及第二擴增中之介質皆不含血清。在一實施態樣中，擴增TIL數量使用不超過一種細胞培養基。可使用任何合適的細胞培養基，例如AIM-V細胞介質(L-麩醯胺酸、50 μ M鏈黴素硫酸鹽及10 μ M硫酸建它黴素)細胞培養基(Invitrogen, Carlsbad CA)。就此而言，本發明方法有利地減少擴增TIL數量所需的介質的量及介質類型的數量。在一實施態樣中，擴增TIL數量可包含頻繁性不超過每三或四天一次地餵養細胞。在氣體可通透容器中擴增細胞數量藉由減少擴增細胞所需的餵養頻率，簡化擴增細胞數量所需之程序。

【0701】 在一實施態樣中，在第一及/或第二氣體可通透容器中之細胞介質係未經過濾。使用未經過濾細胞介質可簡化擴增細胞數量所需的程序。在一實施態樣中，在第一及/或第二氣體可通透容器中之細胞介質缺乏 β -巰乙醇(BME)。

【0702】 在一實施態樣中，該方法的期間包含自哺乳動物獲得腫瘤組織樣本；在其中含有細胞介質之第一氣體可通透容器中培養腫瘤組織樣本；自腫瘤組織樣本獲得TIL；在含有細胞介質之第二氣體可通透容器中擴增TIL數量一段約7至14天例如約11天的期間。在一些實施態樣中，REP前係約7至14天，例如約11天。在一些實施態樣

中，REP係約7至14天，例如約11天。

【0703】在一實施態樣中，TIL係在氣體可通透容器中擴增。已使用氣體可通透容器來擴增TIL，且使用PBMC、使用所屬技術領域中已知之方法、組成物及裝置，包括該些描述於美國專利申請公開案第2005/0106717 A1號者，其揭露以引用方式併入本文中。在一實施態樣中，TIL係在氣體可通透袋子中擴增。在一實施態樣中，TIL使用在氣體可通透袋子中擴增TIL的細胞擴增系統擴增，諸如Xuri細胞擴增系統W25 (GE Healthcare)。在一實施態樣中，TIL使用在氣體可通透袋子中擴增TIL的細胞擴增系統擴增，諸如WAVE生物反應器系統，亦稱為Xuri細胞擴增系統W5 (GE Healthcare)。在一實施態樣中，細胞擴增系統包括氣體可通透細胞袋子，該袋子的體積選自由約100 mL、約200 mL、約300 mL、約400 mL、約500 mL、約600 mL、約700 mL、約800 mL、約900 mL、約1 L、約2 L、約3 L、約4 L、約5 L、約6 L、約7 L、約8 L、約9 L及約10 L所組成之群組。

【0704】在一實施態樣中，TIL可在G-Rex培養瓶(可購自Wilson Wolf Manufacturing)中擴增。該等實施態樣允許細胞族群自約 5×10^5 細胞/cm²擴增至介於 10×10^6 與 30×10^6 細胞/cm²之間。在一實施態樣中，此係未進行餵養。在一實施態樣中，此係未進行餵養，只要G-Rex培養瓶中的介質位在約10 cm的高度。在一實施態樣中，不進行餵養，但添加一或多種細胞介素。在一實施態樣中，細胞介素

可為作為推注添加，不需要將細胞介素與介質混合。該等容器、裝置及方法係所屬技術領域中已知且已用於擴增 TIL，且包括該些描述於美國專利申請公開案第 US 2014/0377739A1號、國際專利公開號 WO 2014/210036 A1、美國專利申請公開案第 us 2013/0115617 A1號、國際專利公開號 WO 2013/188427 A1、美國專利申請公開案第 US 2011/0136228 A1號、美國專利第 US 8,809,050 B2號、國際專利公開號 WO 2011/072088 A2、美國專利申請公開案第 US 2016/0208216 A1號、美國專利申請公開案第 US 2012/0244133 A1號、國際專利公開號 WO 2012/129201 A1、美國專利申請公開案第 US 2013/0102075 A1號、美國專利第 US 8,956,860 B2號、國際專利公開號 WO 2013/173835 A1、美國專利申請公開案第 US 2015/0175966 A1號，彼等揭露以引用方式併入本文中。該等過程亦描述於 Jin et al., *J. Immunotherapy*, 2012, 35:283-292。

A. 可選的 TIL 基因工程改造

【0705】 在一些實施態樣中，TIL 視需要經基因工程改造以包括額外功能性，包括但不限於高親和性 T 細胞受體 (TCR)，例如靶向腫瘤相關抗原 (諸如 MAGE-1、HER2 或 NY-ESO-1) 之 TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子 (例如間皮素) 或細胞系限制細胞表面分子 (例如 CD19) 結合之嵌合抗原受體 (CAR)。

【0706】

B.可選的TIL冷凍保存

【0707】主體TIL族群或經擴增TIL族群視需要可經冷凍保存。在一些實施態樣中，冷凍保存發生於治療性TIL族群。在一些實施態樣中，冷凍保存發生於在第二擴增後經收集的TIL。在一些實施態樣中，冷凍保存發生於圖8的例示性步驟F中的TIL。在一些實施態樣中，TIL係冷凍保存於輸注袋中。在一些實施態樣中，TIL係經冷凍保存然後放入輸注袋中。在一些實施態樣中，TIL係經冷凍保存且不放入輸注袋中。在一些實施態樣中，冷凍保存使用冷凍保存介質執行。在一些實施態樣中，冷凍保存介質含有二甲亞砜(DMSO)。此通常可藉由將TIL族群放入冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲亞砜(DMSO))中完成。將細胞溶液放入冷凍小瓶中且儲存在-80°C下24小時，可選的轉移至氣態氮冷凍器中冷凍保存。見Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986。

【0708】當適當時，將細胞自冷凍器移出並在37°C水浴中解凍，直到大約4/5的溶液解凍。將細胞大致上重懸於完全介質中且視需要洗滌一或多次。在一些實施態樣中，解凍的TIL可經計數且依所屬技術領域中已知之方式評估存活性。

【0709】在一較佳實施態樣中，TIL族群係使用CS10冷凍保存介質(CryoStor 10, BioLife Solutions)冷凍保存。在一較佳實施態樣中，TIL族群係使用含有二甲亞砜(DMSO)的冷凍保存介質冷凍保存。在一較佳實施態樣

中，TIL族群係使用1：1(體積:體積)比例的CS10及細胞培養基冷凍保存。在一較佳實施態樣中，TIL族群係使用約1：1(體積:體積)比例的CS10及細胞培養基冷凍保存，進一步包含額外的IL-2。

【0710】如上於步驟A至E所討論，冷凍保存可發生在TIL擴增過程中的許多時點。

【0711】如上所討論且例示於如圖8中提供的步驟A至E，冷凍保存可發生在TIL擴增過程中的許多時點。在一些實施態樣中，在第二擴增(例如根據圖A步驟D所提供)後的經擴增TIL族群可經冷凍保存。冷凍保存通常可藉由將TIL族群放入冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲亞砜(DMSO))中完成。將細胞溶液放入冷凍小瓶中且儲存在-80°C下24小時，可選的轉移至氣態氮冷凍器中冷凍保存。見Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986。在一些實施態樣中，TIL係冷凍保存於5% DMSO中。在一些實施態樣中，TIL係冷凍保存於細胞培養基加5% DMSO中。在一些實施態樣中，TIL係根據實例16所提供之方法冷凍保存。

【0712】在一些實施態樣中，在根據步驟B之第一擴增後的主體TIL族群或在一或多個根據步驟D之第二擴增後的經擴增TIL族群可經冷凍保存。冷凍保存通常可藉由將TIL族群放入冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲亞砜(DMSO))中完成。將細胞溶液放入冷凍小瓶中且儲存在-80°C下24小時，可選的轉移至氣態氮冷凍器

中冷凍保存。見Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986。

【0713】 當適當時，將細胞自冷凍器移出並在37°C水浴中解凍，直到大約4/5的溶液解凍。將細胞大致上重懸於完全介質中且視需要洗滌一或多次。在一些實施態樣中，解凍的TIL可經計數且依所屬技術領域中已知之方式評估存活性。

【0714】 在一些情況下，步驟B的TIL族群可使用以下討論之規程立即冷凍保存。替代地，主體TIL族群可經受步驟C及步驟D且接著在步驟D後冷凍保存。類似地，在其中基因修飾的TIL將用於療法中的情況中，步驟B或步驟D的TIL族群可經受基因修飾以用於合適治療。

II. 治療患者之方法

【0715】 治療方法始於初始TIL收集及培養TIL。該等方法皆已由所屬技術領域例如Jin et al., *J. Immunotherapy*, 2012, 35(3):283-292描述，其全文以引用方式併入本文中。治療方法之實施態樣係描述於以下所有章節，包括實例。

【0716】 根據本文所述之方法包括例如以上步驟A至F所述或根據以上步驟A至F(亦如例如圖8所述)產生的擴增TIL有治療癌症患者的具體用途(例如Goff, et al., *J. Clinical Oncology*, 2016, 34(20):2389-239以及補充內容所述)；其全文以引用方式併入本文中。在一些實施態樣

中，TIL係如先前描述生長自轉移性黑色素瘤的經切除之寄存物(見Dudley, et al., *J Immunother.*, 2003, 26:332-342；其全文以引用方式併入本文中)。新鮮腫瘤可在無菌條件下分割。可收集代表性樣本進行正式病理分析。可使用2 mm³至3 mm³的單一片段。在一些實施態樣中，獲得每患者5、10、15、20、25或30個樣本。在一些實施態樣中，獲得每患者20、25或30個樣本。在一些實施態樣中，獲得每患者20、22、24、26或28個樣本。在一些實施態樣中，獲得每患者24個樣本。樣本可放入24孔板之個別孔中，維持於含有高劑量IL-2 (6,000 IU/mL)之生長介質中且監測腫瘤的破壞及/或TIL的增生。任何在處理後仍有存活細胞的腫瘤可如本文所述經酶消化成單一細胞懸浮液且經冷凍保存。

【0717】 在一些實施態樣中，成功生長的TIL可經取樣進行表型分析(CD3、CD4、CD8及CD56)且當可用時在自體腫瘤測試。如果整夜共培養產生干擾素- γ (IFN- γ)水準 > 200 pg/mL且為背景的二倍，則TIL可被視為反應性。(Goff, et al., *J Immunother.*, 2010, 33:840-847；其全文以引用方式併入本文中)。在一些實施態樣中，可選擇具有自體反應性或足夠生長模式證據的培養進行第二擴增(例如根據圖8步驟D提供的第二擴增)，包括有時稱為快速擴增(REP)的第二擴增。在一些實施態樣中，選擇具有高自體反應性(例如在第二擴增期間高增生)的擴增TIL進行額外第二擴增。在一些實施態樣中，選擇具有高自體反應性

(例如在圖8步驟D提供的第二擴增期間的高增生)的TIL進行根據圖8步驟D的額外第二擴增。

【0718】在一些實施態樣中，患者並不直接移入ACT(過繼性細胞轉移)，例如，在一些實施態樣中，不立即利用在腫瘤收集及/或第一擴增後的細胞。在該些實施態樣中，TIL可經冷凍保存且在投予至患者之前2天解凍。在該些實施態樣中，TIL可經冷凍保存且在投予至患者之前1天解凍。在一些實施態樣中，TIL可經冷凍保存且在投予至患者之前立即解凍。

【0719】輸注袋TIL冷凍保存樣本的細胞表型可藉由流動式細胞測量術(例如FlowJo)分析表面標誌CD3、CD4、CD8、CCR7及CD45RA(BD BioSciences)，以及藉由本文所述之任何方法分析。使用標準連結酶免疫吸收測定技術測量血清細胞介素。血清IFN-g上升定義為>100 pg/mL且大於4 3基線水準。

【0720】在一些實施態樣中，藉由本文提供之方法(例如該些在圖8例示者)產生之TIL提供意外改善TIL的臨床療效。在一些實施態樣中，藉由本文提供之方法(例如該些在圖8例示者)產生之TIL相較於藉由除該些在本文中描述之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8例示之方法以外的方法)產生之TIL展現增加的臨床療效。在一些實施態樣中，除該些在本文中描述之方法以外的方法包括稱為過程1C及/或第1代(Gen 1)的方法。在一些實施態樣中，增加療效係藉由DCR、ORR及/或其他臨床反應測量。在一些

實施態樣中，藉由本文提供之方法(例如該些在圖8例示者)產生之TIL相較於藉由除該些在本文中描述之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8例示之方法以外的方法，例如第1代過程)產生之TIL展現類似的發生反應所需時間(time to response)及安全性輪廓。

【0721】在一些實施態樣中，IFN- γ 指示治療療效及/或增加臨床療效。在一些實施態樣中，TIL治療個體之血液中的IFN- γ 指示活性TIL。在一些實施態樣中，採用IFN- γ 產生的效力測定。IFN- γ 產生是細胞毒性潛力的另一種測量。IFN- γ 產生可藉由判定經藉由本發明之方法(包括例如該些在圖8中描述之方法)製備之TIL治療之個體的血液、血清或離體TIL中之細胞介素IFN- γ 水準來測量。在一些實施態樣中，IFN- γ 增加指示經藉由本發明之方法產生之TIL治療之患者的治療療效。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 增加一倍、二倍、三倍、四倍或五倍或更多倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 分泌增加一倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 分泌增加二倍。在

一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 分泌增加三倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 分泌增加四倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 分泌增加五倍。在一些實施態樣中，IFN- γ 係使用Quantikine ELISA套組測量。在一些實施態樣中，IFN- γ 係於經藉由本發明之方法(包括例如該些在圖8中描述之方法)製備之TIL治療之個體的離體TIL中測量。在一些實施態樣中，IFN- γ 係於經藉由本發明之方法(包括例如該些在圖8中描述之方法)製備之TIL治療之個體的血液中測量。在一些實施態樣中，IFN- γ 係於經藉由本發明之方法(包括例如該些在圖8中描述之方法)製備之TIL治療之個體的TIL血清中測量。

【0722】在一些實施態樣中，藉由本發明之方法(包括該些在例如圖8中描述之方法)製備之TIL相較於藉由其他方法(包括該些非在圖8例示之方法，諸如例如稱為過程1C方法之方法)產生之TIL展現增加的多株性。在一些實施態樣中，顯著改良之多株性及/或增加之多株性指示治療療效及/或增加臨床療效。在一些實施態樣中，多株性係

指 T 細胞貯庫多樣性。在一些實施態樣中，多株性增加可指示關於投予藉由本發明之方法產生之 TIL 的治療療效。在一些實施態樣中，相較於使用在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 8 體現之方法以外的方法)製備之 TIL，多株性增加一倍、二倍、十倍、100 倍、500 倍或 1000 倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 8 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的患者，多株性增加一倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 8 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的患者，多株性增加二倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 8 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的患者，多株性增加十倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 8 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的患者，多株性增加 100 倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 8 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的患者，多株性增加 500 倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 8 體現之方法以外的

方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加1000倍。

【0723】療效的測量可包括疾病控制率(DCR)以及整體反應率(ORR)，如所屬技術領域中已知及本文中所述。

1.治療癌症及其他疾病之方法

【0724】本文所述之組成物及方法可用於治療疾病之方法中。在一實施態樣中，彼等用於治療過度增生性病變。彼等亦可用於治療其他如本文及以下段落所述之病變。

【0725】在一些實施態樣中，過度增生性病變係癌症。在一些實施態樣中，過度增生性病變係實質腫瘤癌症。在一些實施態樣中，實質腫瘤癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人乳突瘤病毒所造成的癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌及腎細胞癌。在一些實施態樣中，過度增生性病變係血液惡性病。在一些實施態樣中，實質腫瘤癌症係選自由下列所組成之群組：慢性淋巴球性白血病、急性淋巴母細胞白血病、瀰漫性大型B細胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤及外套細胞淋巴瘤。

【0726】在一實施態樣中，本發明包括用TIL族群治療癌症之方法，其中患者在根據本揭露輸注TIL之前先經非骨髓清除式化療治療。在一實施態樣中，非骨髓清除式化療係環磷醯胺60 mg/kg/d共2天(TIL輸注之前第27及26

天)及氟達拉濱 25 mg/m²/d 共 5 天 (TIL 輸注之前第 27 至 23 天)。在一實施態樣中，在根據本揭露之非骨髓清除式化療及 TIL 輸注(第 0 天)之後，患者每 8 小時接受 720,000 IU/kg 靜脈內 IL-2 的靜脈內輸注至生理耐受。

【0727】 在本文中描述之化合物及化合物之組合在治療、預防及/或處理所示疾病或病症的療效可使用各種所屬技術領域中已知之模型測試，該等模型提供人疾病治療之指南。例如，用於判定卵巢癌治療療效的模型係描述於例如 Mullany, et al., *Endocrinology* 2012, 153, 1585-92；及 Fong, et al., *J. Ovarian Res.* 2009, 2, 12。用於判定胰癌治療療效的模型係描述於 Herreros-Villanueva, et al., *World J. Gastroenterol.* 2012, 18, 1286-1294。用於判定乳癌治療療效的模型係描述於例如 Fantozzi, *Breast Cancer Res.* 2006, 8, 212。用於判定黑色素瘤治療療效的模型係描述於例如 Damsky, et al., *Pigment Cell & Melanoma Res.* 2010, 23, 853-859。用於判定肺癌治療療效的模型係描述於例如 Meuwissen, et al., *Genes & Development*, 2005, 19, 643-664。用於判定肺癌治療療效的模型係描述於例如 Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2009, 2, 55-60；及 Sano, *Head Neck Oncol.* 2009, 1, 32。

【0728】 在一些實施態樣中，IFN- γ 指示過度增生性病徵治療的治療療效。在一些實施態樣中，TIL 治療個體之血液中的 IFN- γ 指示活性 TIL。在一些實施態樣中，採用 IFN- γ 產生的效力測定。IFN- γ 產生是細胞毒性潛力的另一

種測量。IFN- γ 產生可藉由判定經藉由本發明之方法(包括例如該些在圖8中描述之方法)製備之TIL治療之個體的血液中之細胞介素IFN- γ 水準來測量。在一些實施態樣中，藉由本方法獲得之TIL提供經本方法之TIL治療之個體相較於經使用稱為過程1C(如圖13例示)之方法所製備的TIL治療之個體的血液中增加之IFN- γ 。在一些實施態樣中，IFN- γ 增加指示經藉由本發明之方法產生之TIL治療之患者的治療療效。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 增加一倍、二倍、三倍、四倍或五倍或更多倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 分泌增加一倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 分泌增加二倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 分泌增加三倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療

的患者，IFN- γ 分泌增加四倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN- γ 分泌增加五倍。在一些實施態樣中，IFN- γ 係使用Quantikine ELISA套組測量。在一些實施態樣中，IFN- γ 係使用Quantikine ELISA套組測量。在一些實施態樣中，IFN- γ 係於來自經藉由本發明之方法產生之TIL治療之患者的離體TIL中測量。在一些實施態樣中，IFN- γ 係於經藉由本發明之方法產生之TIL治療之患者的血液中測量。在一些實施態樣中，IFN- γ 係於經藉由本發明之方法產生之TIL治療之患者的血清中測量。

【0729】在一些實施態樣中，藉由本發明之方法(包括該些在例如圖8中描述之方法)製備之TIL相較於藉由其他方法(包括該些非在圖8例示之方法，諸如例如稱為過程1C方法之方法)產生之TIL展現增加的多株性。在一些實施態樣中，顯著改良之多株性及/或增加之多株性指示治療療效及/或增加癌症治療的臨床療效。在一些實施態樣中，多株性係指T細胞貯庫多樣性。在一些實施態樣中，多株性增加可指示關於投予藉由本發明之方法產生之TIL的治療療效。在一些實施態樣中，相較於使用在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL，多株性增加一倍、二倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外

的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加一倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加二倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加十倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加100倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加500倍。在一些實施態樣中，相較於未治療患者及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖8體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加1000倍。

2. 共投方法

【0730】 在一些實施態樣中，如本文所述產生之TIL(包括例如衍生自圖8之步驟A至F所述之方法的TIL)可與一或多種免疫檢查點調節劑(諸如以下描述之抗體)組合

投予。例如，靶向PD-1且可與本發明之TIL共同投予之抗體包括例如但不限於尼沃魯單抗(BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®)、派姆單抗(lambrolizumab, MK03475 or MK-3475, Merck; Keytruda®)、人源化抗PD-1抗體JS001 (ShangHai JunShi)、單株抗PD-1抗體TSR-042 (Tesar, Inc.)、匹利珠單抗(抗PD-1 mAb CT-011, Medivation)、抗PD-1單株抗體BGB-A317 (BeiGene)及/或抗PD-1抗體SHR-1210 (ShangHai HengRui)、人單株抗體REGN2810 (Regeneron)、人單株抗體MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb)及/或人源化抗PD-1 IgG4抗體PDR001 (Novartis)。在一些實施態樣中，PD-1抗體係來自殖株：RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell cat# BP0146。其他適用於與根據如本文中描述之步驟A至F所產生的TIL共投之方法中的合適抗體為抗PD-1抗體，其揭示於美國專利第8,008,449號(以引用方式併入本文中)。在一些實施態樣中，抗體或其抗原結合部分與PD-L1特異性結合且抑制其與PD-1的交互作用，藉此增加免疫活性。任何所屬技術領域中已知之與PD-L1結合且破壞PD-1與PD-L1之間的交互作用且刺激抗腫瘤免疫反應的抗體皆適用於與根據如本文中描述之步驟A至F所產生的TIL共投之方法中。例如，靶向PD-L1且在臨床試驗中的抗體包括BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb)及MPDL3280A (Genentech)。其他靶向PD-L1的合適抗體揭示於美國專利第7,943,743號，其以引用方式併入本文中。所屬技術領域中具有通常知識者將理解，任何與PD-1或PD-

L1結合、破壞PD-1/PD-L1交互作用且刺激抗腫瘤免疫反應的抗體皆適用於與根據如本文中描述之步驟A至F所產生的TIL共投之方法中。在一些實施態樣中，當個體具有的癌症類型為單獨投予抗PD-1抗體所難治時，對於投予根據步驟A至F產生之TIL組合的個體共投抗PD-1抗體。在一些實施態樣中，當患者具有難治性黑色素瘤時，對患者投予TIL與抗PD-1之組合。在一些實施態樣中，當患者具有非小細胞肺癌(NSCLC)時，對患者投予TIL與抗PD-1之組合。

3.可選的患者淋巴球耗盡前處理

【0731】在一實施態樣中，本發明包括用TIL族群治療癌症之方法，其中患者在根據本揭露輸注TIL之前先經非骨髓清除式化療治療。在一實施態樣中，本發明包括用於治療已先經非骨髓清除式化療治療之患者的癌症之TIL族群。在一實施態樣中，TIL族群係用於輸注投予。在一實施態樣中，非骨髓清除式化療係環磷醯胺60 mg/kg/d共2天(TIL輸注之前第27及26天)及氟達拉濱25 mg/m²/d共5天(TIL輸注之前第27至23天)。在一實施態樣中，在根據本揭露之非骨髓清除式化療及TIL輸注(第0天)之後，患者每8小時接受720,000 IU/kg靜脈內IL-2(阿地介白素，以PROLEUKIN市售)的靜脈內輸注至生理耐受。在某些實施態樣中，TIL族群係與IL-2組合用於治療癌症，其中IL-2在TIL族群之後投予。

【0732】實驗發現指示在過繼性轉移腫瘤特異性T淋巴球之前，藉由清除調節T細胞且競爭免疫系統的元件(「細胞介素匯(cytokine sinks)」)進行淋巴球耗盡扮演增強治療療效的關鍵角色。因此，本發明之一些實施態樣在導入本發明之TIL之前，對患者進行淋巴球耗盡步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調理」)。

【0733】一般來說，淋巴球耗盡係使用氟達拉濱或環磷醯胺(活性形式稱為馬磷醯胺)及其組合的投予達成。該等方法描述於Gassner, et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 2011, 60, 75-85、Muranski, et al., *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2006, 3, 668-681、Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 5233-5239及Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 2346-2357，所有全文皆以引用方式併入本文中。

【0734】在一些實施態樣中，氟達拉濱係以0.5 µg/mL至10 µg/mL氟達拉濱之濃度投予。在一些實施態樣中，氟達拉濱係以1 µg/mL氟達拉濱之濃度投予。在一些實施態樣中，氟達拉濱治療係投予1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些實施態樣中，氟達拉濱係以10 mg/kg/天、15 mg/kg/天、20 mg/kg/天、25 mg/kg/天、30 mg/kg/天、35 mg/kg/天、40 mg/kg/天或45 mg/kg/天之劑量投予。在一些實施態樣中，氟達拉濱治療係以35 mg/kg/天投予2至7天。在一些實施態樣中，氟達拉濱治療係以35 mg/kg/天投予4至5天。在一些實施態樣中，氟達拉濱治療係以25 mg/kg/天投予4至5天。

【0735】 在一些實施態樣中，藉由投予環磷醯胺獲得 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度的馬磷醯胺(環磷醯胺之活性形式)。在一些實施態樣中，藉由投予環磷醯胺獲得 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度的馬磷醯胺(環磷醯胺之活性形式)。在一些實施態樣中，環磷醯胺治療係投予 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天或 7 天或更多天。在一些實施態樣中，環磷醯胺係以 100 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、150 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、175 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、200 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、225 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、250 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、275 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或 300 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之劑量投予。在一些實施態樣中，環磷醯胺係經靜脈內投予(即 i.v.)。在一些實施態樣中，環磷醯胺治療係以 35 $\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 投予 2 至 7 天。在一些實施態樣中，環磷醯胺治療係以 250 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ i.v. 投予 4 至 5 天。在一些實施態樣中，環磷醯胺治療係以 250 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ i.v. 投予 4 天。

【0736】 在一些實施態樣中，淋巴球耗盡係藉由一起投予氟達拉濱及環磷醯胺至患者執行。在一些實施態樣中，氟達拉濱係以 25 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ i.v. 投予且環磷醯胺係以 250 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ i.v. 投予 4 天。

【0737】 在一實施態樣中，淋巴球耗盡係藉由投予環磷醯胺且劑量為 60 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 共二天，隨後投予氟達拉濱且劑量為 25 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 共五天執行。

4. IL-2 方案

【0738】 在一實施態樣中，IL-2 方案包含高劑量 IL-2 方案，其中高劑量 IL-2 方案包含靜脈內投予阿地介白素或

其生物類似物或變體，始於投予治療有效部分的治療性 TIL 族群之後當天，其中阿地介白素或其生物類似物或變體係以 0.037 mg/kg 或 0.044 mg/kg IU/kg (患者身體質量) 之劑量每八小時使用 15 分鐘推注靜脈內輸液投予直到耐受為止，最多 14 劑。在休息 9 天之後，可重複此時程再投予 14 劑，最多總共 28 劑。

【0739】在一實施態樣中，IL-2 方案包含漸減 IL-2 方案。漸減 IL-2 方案已描述於 O'Day, et al., J. Clin. Oncol. 1999, 17, 2752-61 及 Eton, et al., Cancer 2000, 88, 1703-9，彼等之揭露以引用方式併入本文中。在一實施態樣中，漸減 IL-2 方案包含在 6 小時內靜脈內投予 18×10^6 IU/m²，隨後在 12 小時內靜脈內投予 18×10^6 IU/m²，隨後在 24 小時內靜脈內投予 18×10^6 IU/m²，隨後在 72 小時內靜脈內投予 4.5×10^6 IU/m²。此治療週期可每 28 天重複一次，最多可達四個週期。在一實施態樣中，漸減 IL-2 方案包含第 1 天 18,000,000 IU/m²，第 2 天 9,000,000 IU/m² 及第 3 及 4 天 4,500,000 IU/m²。

【0740】在一實施態樣中，IL-2 方案包含每 1、2、4、6、7、14 或 21 天以 0.10 mg/天至 50 mg/天之劑量投予聚乙二醇化 IL-2。

5. 過繼性細胞轉移

【0741】過繼性細胞轉移 (ACT) 是一種非常有效的免疫療法形式且涉及將具有抗腫瘤活性的免疫細胞轉移至癌

症患者。ACT是涉及體外辨識具有抗腫瘤活性之淋巴球、體外擴增這些細胞至大量及將彼等輸注至荷癌宿主的治療方式。用於過繼性轉移之淋巴球可衍生自經切除之腫瘤的基質(腫瘤浸潤淋巴球或TIL)。用於ACT之TIL可如本文所述製備。在一些實施態樣中，TIL係根據例如圖8描述之方法製備。如果彼等經基因工程改造以表現抗腫瘤T細胞受體(TCR)或嵌合抗原受體(CAR)、經混合之淋巴球腫瘤細胞培養(MLTC)濃化或使用自體抗原呈現細胞及腫瘤衍生肽選殖，則彼等亦可衍生自或來自血液。其中淋巴球源自待輸注荷癌宿主的ACT稱為自體ACT。美國專利公開號2011/0052530關於一種用於執行過繼性細胞療法以促進癌症消退之方法，主要用於治療罹患轉移性黑色素瘤的患者，該案全文以引用方式併入本文中用於這些方法。在一些實施態樣中，TIL可如本文所述投予。在一些實施態樣中，TIL可以單一劑量投予。該投予可為注射，例如靜脈注射。在一些實施態樣中，TIL及/或細胞毒性淋巴球可以多個劑量投予。給藥可為每年一次、二次、三次、四次、五次、六次或多於六次。給藥可為一個月一次、每二週一次、每週一次或每二天一次。TIL及/或細胞毒性淋巴球的投予可視需要持續進行。

6. 例示性治療實施態樣

【0742】 在一些實施態樣中，本揭露提供用腫瘤浸潤淋巴球(TIL)族群治療癌症之方法，該方法包含步驟：(a)

自患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；(b)在第一細胞培養基中執行第一 TIL 族群的初始擴增以獲得第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於第一 TIL 族群至少 5 倍，且其中該第一細胞培養基包含 IL-2；(c)在第二細胞培養基中使用骨髓樣人工抗原呈現細胞(骨髓樣 aAPC)族群執行第二 TIL 族群的快速擴增以獲得第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群在快速擴增開始 7 天後於數量上高於第二 TIL 族群至少 50 倍；且其中該第二細胞培養基包含 IL-2 及 OKT-3；(d)投予治療有效部分的該第三 TIL 族群至癌症患者。在一些實施態樣中，本揭露用於治療癌症之腫瘤浸潤淋巴球(TIL)族群，其中該 TIL 族群可藉由包含步驟之方法獲得：

(b)在第一細胞培養基中執行自患者所切除的腫瘤獲得之第一 TIL 族群的初始擴增以獲得第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於第一 TIL 族群至少 5 倍，且其中該第一細胞培養基包含 IL-2；(c)在第二細胞培養基中使用骨髓樣人工抗原呈現細胞(骨髓樣 aAPC)族群執行第二 TIL 族群的快速擴增以獲得第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群在快速擴增開始 7 天後於數量上高於第二 TIL 族群至少 50 倍；且其中該第二細胞培養基包含 IL-2 及 OKT-3；(d)投予治療有效部分的該第三 TIL 族群至癌症患者。在一些實施態樣中，方法包含自患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群之第一步驟(a)。在一些實施態樣中，該 IL-2 係以約 3000 IU/mL 的初始濃度存在且 OKT-3 抗體係以約 30 ng/mL 的初始濃度存在於該第二細胞培養基中。在一些實施態樣中，第一擴

增係於不超過14天的期間執行。在一些實施態樣中，第一擴增使用氣體可通透容器執行。在一些實施態樣中，第二擴增使用氣體可通透容器執行。在一些實施態樣中，在快速擴增中第二TIL族群對aAPC族群的比例係介於1至80與1至400之間。在一些實施態樣中，在快速擴增中第二TIL族群對aAPC族群的比例係約1至300。在一些實施態樣中，所治療的癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人乳突瘤病毒所造成的癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌及腎細胞癌。在一些實施態樣中，欲治療之癌症係選自由黑色素瘤、卵巢癌及子宮頸癌所組成之群組。在一些實施態樣中，欲治療之癌症係黑色素瘤。在一些實施態樣中，欲治療之癌症係卵巢癌。在一些實施態樣中，欲治療之癌症係子宮頸癌。在一些實施態樣中，治療癌症之方法進一步包含在向患者投予第三TIL族群之前用非骨髓清除式淋巴球耗盡方案治療該患者的步驟。在一些實施態樣中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含投予劑量為60 mg/m²/天之環磷醯胺計二天且隨後投予劑量為25 mg/m²/天之氟達拉濱(fludarabine)計五天的步驟。在一些實施態樣中，高劑量IL-2方案包含每八小時以15分鐘推注靜脈內輸液(bolus intravenous infusion)投予600,000或720,000 IU/kg的阿地介白素或其生物類似物或變體直到耐受為止。在一些實施態樣中，用於治療之TIL已與一或多種靶向如本文所述之基因(包括PD-1、

LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB)之sd-RNA接觸，該sd-RNA可在第一及/或第二擴增期間(例如根據圖8之步驟B、C及/或D)添加至細胞培養基，其中TIL及其他劑可以選自由0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、2 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質或10 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質所組成之群組的量添加。在一些實施態樣中，用於治療之TIL已與一或多種靶向如本文所述之基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB)之sd-RNA接觸，該sd-RNA可在第一及/或第二擴增期間(例如根據圖8之步驟B、C及/或D)以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至TIL培養。在一實施態樣中，用於治療之TIL已與一或多種靶向如本文所述之基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB)之sd-RNA接觸，其中TIL及其他劑可在第一及/或第二擴增期間(例如根據圖8之步驟B、C及/或D)以選自由0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL、1 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、2 μM sd-RNA/10,000個TIL、5 μM sd-RNA/10,000個TIL或10

μM sd-RNA/10,000個 TIL所組成之群組的量添加。在一實施態樣中，用於治療之 TIL已與一或多種靶向如本文所述之基因(包括 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及 CBLB)之 sd-RNA接觸，其中 TIL及其他劑可在第一及/或第二擴增期間(例如根據圖 8之步驟 B、C及/或 D)以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至 TIL培養。

實例

【0743】 在本文中涵蓋的實施態樣現在參照下列實例描述。這些實例僅為說明之目的而提供，在本文中涵蓋的本揭露不應被視為受到這些實例之限制，反而應視為包含任何及所有因此處所提供之教示而變得明顯之變異。

實例 1：密閉系統測定

【0744】 如本文中所討論，開發規程及測定用於在密閉系統中自患者腫瘤產生 TIL。

【0745】 此實例描述用於在 G-REX裝置中自患者經切除之腫瘤組織產生臨床相關數量的 TIL及冷凍保存最終細胞產物的新穎的簡化程序。此程序的額外態樣描述於實例 2至 8。

程序

【0746】 事前準備：第 0天(提前至多 36小時執行)，

藉由用 50 µg/mL 建它黴素補充 500 mL Hanks 平衡鹽溶液來製備 TIL 單離洗滌緩衝液 (TIWB)。就 10 mg/mL 建它黴素儲備溶液而言，轉移 2.5 mL 至 HBSS。就 50 mg/mL 儲備溶液而言，轉移 0.5 mL 至 HBSS。

【0747】依照 CM2 指示的 LAB-005 「製備用於 PreREP 及 REP 之介質」，用 GlutaMax™ 製備 CM1 介質。儲存在 4°C 下至多 24 小時。使用前允許在 37°C 下溫熱至少 1 小時。

【0748】自 -20°C 冷凍器移出 IL-2 等分試樣且將等分試樣放入 2 至 8°C 冰箱中。移出腫瘤樣品且儲存在 4°C 下直到準備處理為止。

【0749】未使用的腫瘤在 HypoThermasol 中運送或以 CryoStor CS10 中之冷凍片段運送 (兩者皆可購自 BioLife Solutions, Inc.)。

TIL 腫瘤處理

【0750】將下列材料視需要無菌轉移至 BSC，且根據下表 16 標示。

表 16：腫瘤單離材料。

項目	最小數量	過程中標籤
腫瘤	1	N/A
培養皿，150 mm	1	分割
培養皿，100 mm	4	洗滌 1, 2, 3, 4
培養皿，100 mm	1	不佳組織
6孔盤	2	上蓋標籤-「腫瘤片段」 盤底部-「較佳組織」
尺	2	N/A
洗滌緩衝液	1	N/A
鑷子	1	N/A
長鑷子	1	N/A
解剖刀	如需要	N/A

【0751】將 5 mL 建它黴素轉移至 HBSS 瓶。標示為 TIWB。渦漩混合。吸取 50 mL TIWB 至各培養皿。使用長鑷子，將腫瘤自樣品瓶移出並轉移至洗滌 1 培養皿。在洗滌培養皿中在環境溫度下孵養腫瘤 3 分鐘。將腫瘤轉移至洗滌培養皿且在洗滌培養皿中在環境溫度下孵養腫瘤 3 分鐘。在新的洗滌培養皿中重複洗滌。

【0752】測量且記錄腫瘤長度。將腫瘤片 (tumor pieces) 執行初始分割成 10 個中間片且保留各中間片的腫瘤結構。一次處理一個中間腫瘤片，小心地將腫瘤切成至多 3x3x3 mm 片段。對剩餘的中間腫瘤片重複。

【0753】如果可用的腫瘤片段少於 4 個，將其他片段當作可用來使用以達成 40 個片段的目標。當小於 40 個片段時，將 10 至 40 個放入單一 G-Rex 100M 培養瓶中。

接種 G-Rex 100M 培養瓶

【0754】將下列材料視需要無菌轉移至 BSC，且根據下表 4 標示。

表 17：用於接種培養瓶之額外材料。

項目	最小數量	過程中標籤
G-Rex 100M 培養瓶	如需要	Lot#
溫熱的 CM1	如需要	Lot#
IL-2 等分試樣	如需要	Lot#

【0755】每公升的 CM1 用 1 mL 的 IL-2 儲備溶液 (6×10^6 IU/mL) 補充。

【0756】將 1000 mL 之含有 6,000 IU/mL 的 IL-2 之預熱 CM1 放入依照下表 5 判定之各所需的 G-REX 100M 生物反應器中。使用移液吸管，將適當數量的腫瘤片段轉移至各 G-Rex 100M 培養瓶，依照表 5 分布片段。當轉移至 G-Rex 100M 培養瓶之一或多個腫瘤片段漂浮時，獲得一個額外的若可用之腫瘤片段且將其轉移至 G-Rex 100M 培養瓶。記錄添加至各培養瓶的片段總數。將各 G-REX 100M 生物反應器放入 37°C、5% CO₂ 孵養箱中。

【0757】當獲得 >41 個片段時，將 1000 mL 的預熱完全 CM1 放入第二 G-REX 100M 生物反應器中。

表 18：所需的G-REX生物反應器數量。

片段數量	G-REX	G-REX 數目	所需的 CM1
1至40個	G-REX 100M	1	1000 mL
41至80個分布在培養瓶之間	G-REX 100M	2	2000 mL
>80個	在15分鐘預孵養後，將在CS10中之片段冷凍		

事前製備：第11天(提前至多24小時製備)

【0758】用 GlutaMax 製備 6 L 的 CM2。使用 CM2 指示的參考實驗室程序「製備用於 PreREP 及 REP 之介質」。使用前在 37°C 下溫熱 1 小時。解凍 IL-2 等分試樣：自冷凍器移出 IL-2 等分試樣且放在 4°C 下。

收集 TIL(第11天)

【0759】自孵養箱移出 G-REX -100M 培養瓶且放在 BSC2 中。不擾動培養瓶底部的細胞。使用 GatherRex 或蠕動泵自培養瓶抽吸約 900 mL 的細胞培養上清液。藉由輕柔渦旋培養瓶來重懸 TIL。觀察到所有細胞皆與膜脫離。將殘餘之細胞懸浮液轉移至適當大小的血液轉移包 (300 至 1000 mL)。小心不要讓片段轉移至血液轉移包。將轉移包用 4" 血漿轉移組穿刺。混合細胞懸浮液且使用 3 mL 注射器移出 1 mL TIL 懸浮液進行細胞計數。將轉移包放入孵養箱中直到準備使用為止。

介質製備

【0760】 允許介質在 37°C 下溫熱 >1hr。添加 3 mL 的 6×10^6 IU/mL rhIL-2 原液至 6 L CM2 以達到 3,000 IU/mL rhIL-2 的最終濃度(「完全 CM2」)。將具有母魯爾(female luer)之 4”血漿轉移組無菌接合至 1L 轉移包。將 500mL 完全 CM2 轉移至 1L 轉移包。使用帶針頭的 1.0mL 注射器抽取 150 μ L 的 1 mg/mL 抗 CD3(殖株 OKT3)且轉移至 500 mL 「完全 CM2」。使用前儲存在 37°C 下。

培養瓶製備

【0761】 將 4.5L 「完全 CM2」轉移至 G-REX -500M 培養瓶且將培養瓶放入 37°C 孵養箱中直到就緒為止。

解凍經照射的餵養細胞

【0762】 利用來自二或更多個供體之 5.0×10^9 個同種異體經照射餵養細胞以供使用。自 LN2 冷凍器移出餵養細胞。在 37°C 孵養箱或珠浴中解凍餵養細胞。當幾乎完全解凍但仍冰冷時，自浴中移出餵養細胞。將各餵養細胞袋直接添加至開放的 G-Rex 500M 以確保足夠數量的經照射細胞 (5×10^9 個細胞， $\pm 20\%$)。移出具有 500 mL 「完全 CM2」 +OKT3 之 1L 轉移包且轉移至 BSC。將餵養細胞袋的所有內容物抽取至注射器，記錄體積，且將 5.0×10^9 個同種異體經照射餵養細胞分配至轉移包。

【0763】當 +/-10% 的目標細胞數量 (5.0×10^9) 達到 >70% 存活性時，即繼續進行。當小於 90% 的目標細胞數量 (5.0×10^9) 達到 >70% 存活性時，解凍另一袋且重複上述。當達成大於 110% 的目標細胞數量時，計算所欲細胞劑量所需之適當體積且繼續進行。

在 G-REX 500M 培養瓶中共培養 TIL 與餵養細胞

【0764】自孵養箱移出含有製備介質的 G-REX 500M 培養瓶。將餵養細胞轉移包附接至 G-REX -500M 且允許袋中的內容物引流至 500M 中。計算要添加的 TIL 懸浮液體積以達成 200×10^6 個總存活細胞。

$$(\text{TVC}/\text{mL})/200 \times 10^6 = \text{mL}$$

【0765】當 TIL 介於 5 至 200×10^6 個之間的總存活細胞時，將所有 TIL (總體積) 添加至 G-REX-500M。當 TIL 計數大於 200×10^6 個總存活細胞時，添加欲將 200×10^6 個 TIL 分布至個別 G-REX-500M 所需的計算體積。將剩餘的 TIL 離心且以至多 $10^8/\text{mL}$ 於 CS10 中冷凍於至少二個冷凍小瓶，且標示 TIL 識別及冷凍日期。

【0766】將 G-REX -500M 放入 37°C 、5% CO_2 孵養箱中 5 天。

事前準備：第 16 至 18 天

【0767】在 37°C 下溫熱用於小於 50×10^6 個 TIL 起始培養之一個 10L 袋子的 AIM V、大於 50×10^6 個 TIL 起始則溫熱

二個袋子至少 1 hr 或準備使用為止。

執行 TIL 細胞計數：第 16 至 18 天

【0768】自孵養箱移出 G-REX-500M 培養瓶且小心不擾動培養瓶底部的細胞培養。自 G-REX-500M 培養瓶移出 4 L 的細胞培養基且放入無菌容器中。渦漩 G-REX -500M 直到所有 TIL 自膜重懸。將細胞懸浮液轉移至 2L 轉移包。保留 500M 培養瓶以供稍後使用。根據下式計算繼代培養需要的培養瓶總數。將分數進位。

$$\text{總存活細胞} / 1.0 \times 10 = \text{培養瓶數量}$$

製備 CM4

【0769】每二個所需的 500M 培養瓶製備一個 10L 袋子的 AIM-V。視需要溫熱額外介質。就所需的每 10 L 的 AIM-V 而言，添加 100 mL 的 GlutaMAX 以製備 CM4。用 rhIL-2 補充 CM4 介質以達 3,000 IU/mL rhIL-2 之最終濃度。將細胞培養分瓶。將各 G-REX -500M 填充至 5 L。將 TIL 體積平均分布於計算數量的 G-REX -500M 之間。將培養瓶放入 37°C、5% CO₂ 孵養箱中直到 REP 第 22 天收集。

事前準備：第 22 至 24 天

【0770】藉由添加 40mL 的 25% HSA 至二個 1L 袋子的 PlasmaLyte A 7.4 中之各者來製備 2L 的 1% HSA 洗滌緩衝液。匯合至 LOVO 輔助袋子。用 IL-2 以 600 IU/mL 補充 200

mL CS10。在4°C下預冷卻四個750 mL鋁冷凍罐。

收集TIL：第22至24天

【0771】自37°C 孵養箱移出G-REX -500M培養瓶且小心不擾動培養瓶底部的細胞培養。自各培養瓶抽吸且棄置4.5 L的細胞培養上清液。渦漩G-REX -500M培養瓶至完全重懸TIL。收集TIL至生物處理袋。將袋子混合均勻且使用3mL注射器採集2×2 mL樣本進行細胞計數。秤重袋子且發現初始與最終重量之間的差異。使用下列計算判定細胞懸浮液的體積。

$$\text{細胞懸浮液淨重(mL)} / 1.03 = \text{體積(mL)}$$

【0772】過濾TIL及製備LOVO來源袋。一旦所有細胞皆轉移至LOVO來源袋，關閉所有管夾管夾且密封LOVO來源袋管路以移除過濾器且秤重。計算體積。

【0773】調配TIL 1:1於補充有600 IU/mL rhIL-2之冰冷CS10中。

【0774】計算所需的冷凍袋的需要數量。

$$(\text{細胞產物的體積} \times 2) / 100 = \text{需要的袋子數量(向下捨入)}$$

【0775】計算分配至各袋子的體積。

$(\text{細胞產物的體積} \times 2) / \text{需要的袋子數量} = \text{添加至各袋子的體積}$

【0776】將表6中之下列材料無菌轉移至BSC。

表 19：用於TIL冷凍保存之材料。

項目	最小數量	過程中標籤
細胞產物	1	批號
鋁冷凍盒(750 ml)	1	n/a
冰冷 CS10 + IL-2 @600IU/mL	如需要	批號
Cell Connect CC1 裝置	1	n/a
750 mL 冷凍袋	計算	標示等分試樣1- 最大#
100 mL 針筒	冷凍袋 數量+1	n/a
3向活栓	1	n/a
冷凍小瓶	5	TIL冷凍產物衛星小瓶

TIL調配

【0777】連接 LOVO 最終產物、CS10 袋子魯爾鎖及適當數量的冷凍袋。所需 CS10 體積的量相當於 LOVO 最終產物袋子的體積。藉由翻轉混合 LOVO 最終產物袋子。

【0778】將 100 mL 經調配的產物轉移至各冷凍袋。自冷凍袋移除所有氣泡且密封。將密封袋子轉移至 4°C 且放入預冷卻的鋁冷凍罐。

使用控速冷凍器 (CRF) 冷凍保存 TIL。

【0779】遵守控速冷凍器的標準程序。在使用 CRF 後，將冷凍袋儲存於液態氮 (LN₂)。

實例 2：淋巴球耗盡

【0780】細胞計數可在第 7 天及淋巴球耗盡之前進行。最終細胞產物包括經調配於最小 50% HypoThermosol™ 於 Plasma-Lyte A™ 中 (體積/體積) 及至多含有 300 IU/mL IL2

之0.5% HSA(相容於人輸注)中之至多大約 150×10^9 個存活細胞。最終產物可用於以二種輸注體積中之一者投予：

1) 250 mL(於300-mL容量輸注袋中)，當所收集的總TIL $\leq 75 \times 10^9$ 個

或

2) 500 mL(於600-mL容量輸注袋中)，當所收集的總TIL $< 150 \times 10^9$ 個

【0781】 由於在REP步驟期間患者間T細胞擴增率的差異，因此無法預測可經產製用於每位患者最終TIL輸注產物之細胞總數。在3至14天REP之第3、4、5、6、7天的細胞下限設定係基於為了做出使用環磷醯胺加上氟達拉濱化療方案淋巴球耗盡患者的決定所需的最小細胞數量。一旦我們基於此最小達到細胞數量開始進行淋巴球耗盡，我們就致力於以我們在REP到第3至14天中任一天且在許多情況中到第7天所產生的可用數量TIL治療患者。輸注範圍上限(150×10^9 個存活細胞)係基於已知發表的達到臨床反應之安全輸注上限。Radvanyi, et al., Clin Cancer Res 2012, 18, 6758-6770。

實例3：過程2A-第0天

【0782】 此實例描述在實例3至6中描述之2A過程的詳細第0天規程。

【0783】 製備。

【0784】 確認腫瘤洗滌介質、CM1及IL-2在到期日以

內。將CM1(細胞介質1)放入孵養箱中。

方法。

【0785】製備含有6000 IU/mL IL-2之TIL介質CM1：1L CM1及1ml IL-2 (6,000,000 IU/mL)。將25ml的CM1+IL2放入待用於當添加至G-REX片段之50 mL錐形管且放入37°C孵養箱中預熱。

【0786】將975 ml之含有6,000 IU/ml的IL-2之預熱CM1泵送至各G-REX 100MCS生物反應器。將G-REX 100MCS放在孵養箱中直到需要為止。

組織分割

【0787】記錄腫瘤處理的起始時間。將3至5 mL之腫瘤洗滌介質吸取至一個六孔板中之各孔用於過量腫瘤片。吸取50 mL的腫瘤洗滌介質以洗滌培養皿1至3及繫留培養皿(holding dish)。將二個150 mm分割培養皿放入生物安全櫃中。將3個無菌50 mL錐形管放入BSC中。添加5至20 mL的腫瘤洗滌介質至各錐形管。在腫瘤洗滌及分割過程期間，視需要將鑷子及解剖刀浸入腫瘤洗滌介質中。

【0788】將腫瘤自樣品瓶移出並轉移至洗滌1培養皿。在洗滌1培養皿中在環境中孵養腫瘤 ≥ 3 分鐘。將腫瘤轉移至洗滌2培養皿。在洗滌2培養皿中在環境中孵養腫瘤 ≥ 3 分鐘。將腫瘤轉移至洗滌3培養皿。在洗滌3培養皿中在環境中孵養腫瘤 ≥ 3 分鐘。將腫瘤轉移至分割培養皿，測量並記錄腫瘤的長度。

【0789】 將腫瘤片在分割培養皿中執行初始分割成中間片，小心保留各中間片的腫瘤結構。將任何不是正在分割成片段的中間腫瘤片轉移至組織繫留培養皿，以確保組織在整個分割程序期間維持水合。

【0790】 一次處理一個中間腫瘤片，小心地在分割培養皿中將腫瘤切成大約3x3x3 mm片段。持續自中間腫瘤片分割片段，直到所有中間片的組織皆已評估。選擇較佳片段且使用移液吸管將至多4個較佳片段轉移至腫瘤片段培養皿一個圓圈中的洗滌介質液滴中。使用移液吸管解剖刀或鑷子，將盡可能多的不佳組織及廢棄物轉移至「不佳組織(Unfavorable Tissue)」。將所有剩餘組織放入六孔板中的一孔。(黃色脂肪組織或壞死組織指示不佳組織。)持續處理剩餘中間腫瘤片，一次處理一個中間片直到整個腫瘤皆已處理。

【0791】 將至多50個最佳腫瘤片段轉移至含有CM1之標示腫瘤片段的50 mL錐形管。自50 mL錐形管移除漂浮物。記錄片段及漂浮物數量。渦漩具有腫瘤片段之錐形管且將50ml錐形管之內容物倒入G-Rex 100MCS培養瓶中。如果轉移至G-Rex 100M培養瓶之一或多個腫瘤片段漂浮，自較佳組織培養皿獲得一個若可用之額外的腫瘤片段且將其轉移至G-Rex 100M培養瓶。

【0792】 記錄孵養箱#及添加至各培養瓶的片段總數。將G-REX 100M生物反應器放入37°C、5% CO₂孵養箱中。

實例 4：過程 2A-第 11 天

【0793】此實例描述在實例 3 至 6 中描述之 2A 過程的詳細第 11 天規程。

事前準備。

處理前一天：

【0794】CM2 可在處理發生前一天製備。放置在 4°C 下。

【0795】處理當天。

【0796】製備餵養細胞制具(harness)。每 CTF-FORM-318 製備 5 mL 的冷凍保存介質且放在 4°C 下直到需要為止。

【0797】製備 G-Rex 500MCS 培養瓶。使用 10 mL 注射器將每公升 CM2(細胞介質 2)0.5mL 的 IL-2(原液為 6×10^6 IU/mL)經由未使用的無菌母魯爾接頭無菌轉移至生物處理袋。確保所有 IL-2 與介質混合。泵送 4.5 公升的 CM2 介質至 G-Rex 500MCS 中。將 G-Rex 500MCS 放入孵養箱中。

製備經照射餵養細胞

【0798】記錄 1L 轉移包 (TP) 的乾重。將 500mL CM2 藉由重量泵送至 TP 中。在 37°C (+/- 1°C) 水浴中解凍餵養細胞。將最終餵養細胞調配物混合均勻。使用 5 mL 注射器及無針埠，用一些細胞溶液潤洗埠以確保正確取樣且移出 1ml 的細胞，放入經標示用於計數的管中。對餵養細胞樣

本執行單細胞計數且記錄資料並將計數原始資料黏貼至批次紀錄。如果細胞計數 $<5 \times 10^9$ 個，則解凍更多細胞、計數且添加至餵養細胞。重新秤重餵養細胞袋子且計算體積。計算要移出之細胞的體積。

【0799】

添加餵養細胞至 G-REX

【0800】 均勻混合細胞且移出以上計算的體積以達成 5.0×10^9 個細胞。丟棄不需要的細胞。使用 1mL 注射器及 18G 針頭抽取 0.150mL 的 OKT3，移除針頭且經由母魯爾轉移至餵養細胞 TP。將餵養細胞袋子無菌接合至 G-Rex 500MCS 上的紅色管線。鬆開管線管夾且允許餵養細胞藉由重力流入培養瓶中。將 G-Rex 500MCS 放回孵養箱且記錄時間。

【0801】

製備 TIL：記錄 TIL 收集的起始時間

【0802】 自孵養箱小心移出 G-Rex 100MCS。使用 GatheRex 轉移約 900mL 的培養上清液至 1L 轉移包。渦漩培養瓶直到所有細胞皆自膜脫附。檢查膜以確定所有細胞皆脫附。傾斜培養瓶遠離收集管路並允許腫瘤片段沿著邊緣沉降。緩慢地將培養瓶傾向收集管路，以使片段維持在培養瓶的對側。使用 GatheRex 將殘餘之細胞懸浮液轉移至 300mL 轉移包且避免腫瘤片段。重新檢查所有細胞皆自膜移出。如有需要，藉由鬆開 GatheRex 上的管夾且允許一些介質藉由重力流入 G-Rex 100MCS 培養瓶來回洗。劇烈拍

打培養瓶以釋放細胞且泵送至 300ml TP 中。在收集完成後，關閉紅色管線且熱封。

記錄含有細胞懸浮液之 300ml TP 的質量(包括乾質量)且計算細胞懸浮液的體積。均勻混合細胞。無菌附接 5mL 注射器抽取 1mL，放入冷凍小瓶中。用第二注射器重複。這些係用於存活性細胞計數。放入孵養箱中且記錄放入孵養箱中的時間。在各樣本執行單細胞計數且記錄。如有需要，調整總存活 TIL 密度至 $\leq 2 \times 10^8$ 個存活細胞。計算欲移除之體積或附註無須調整。

【0803】 將過量細胞轉移至適當大小錐形管且放入孵養箱中，把蓋子鬆開用於稍後冷凍保存。

【0804】 將 G-Rex 500MCS 自孵養箱移出且將細胞泵送至培養瓶中。將 G-Rex 500MCS 放回孵養箱且記錄放入 G-Rex 孵養箱的時間。

冷凍保存過量品

【0805】 計算欲添加至細胞之冷凍介質的量：

表20：目標細胞濃度為 1×10^8 個/ml

A. 移出之總細胞數(自步驟15)	mL
B. 目標細胞濃度	1×10^8 個細胞 /mL
添加之冷凍介質的體積 (A/B)	mL

【0806】 在 20°C 下以 400 x g 離心 TIL 5 min，使用全速煞車及全速加速。無菌抽吸上清液。將細胞重懸於剩餘流體中，且當處於重懸狀態時，緩慢添加經製備的冷凍介質。等分且放入 -80°C 中。

實例 5：過程 2A-第 16 天

【0807】 此實例描述在實例 3 至 6 中描述之 2A 過程的詳細第 16 天規程。

收集且計數 TIL。

【0808】 在 37°C 孵養箱中溫熱用於小於 50×10^6 個 TIL 起始培養之一個 10L 袋子的 CM4 至少 30 分鐘或準備使用為止。自孵養箱移出 G-Rex 500MCS 培養瓶且使用 GatheRex 將約 4L 的培養上清液轉移至 10L Labtainer。根據適當的 GatheRex 收集指示收集。

【0809】 在移出上清液後，渦漩培養瓶直到所有細胞皆自膜脫附。傾斜培養瓶以確保管子位在培養瓶邊緣。使用 GatheRex 將殘餘之細胞懸浮液轉移至 2L TP 且維持傾斜邊緣直到所有細胞皆已收集。檢視膜上有無附著細胞。劇烈拍打培養瓶以釋放細胞。將細胞添加至 2L TP。將 2 L 轉移包熱封。記錄含細胞懸浮液之轉移包的質量並計算細胞懸浮液的體積。判定細胞懸浮液體積，包括乾質量。

【0810】 輕柔混合細胞且抽取 11ml 並如表 21 所示等分。

表 21：測試參數。

測試	樣本體積	容器
細胞計數及存活性	2個2mL樣本	冷凍小瓶
黴漿菌	1 mL	冷凍小瓶儲存在4°C下直到測試完成。
無菌性	1 mL	接種0.5mL至各一個厭氧及有氧培養瓶
流動式	2 – 2mL	未使用細胞計數(冷凍保存以供未來批次測試)
剩餘細胞		丟棄

【0811】基於細胞懸浮液體積及移出用於QC之體積(11 mL)，計算2 L轉移包中之新體積且記錄體積。

【0812】接種且訂購無菌性測試。將黴漿菌樣本儲存在4°C下黴漿菌測試準備架。放在一旁直到TIL接種為止。

細胞計數：

【0813】執行單細胞計數且記錄資料並將計數原始資料黏貼至批次紀錄。記載稀釋。記載細胞計數器計數程式。驗證正確的稀釋輸入細胞計數器中。計算繼代培養所需的培養瓶總數。

添加IL-2至CM

【0814】放置10L袋子的含有Glutamax之Aim V。抽取5mL的IL-2至注射器(最終濃度為3000 IU/ml)且將IL-2分配

至袋子中。重複於剩餘的 Aim V 袋子。

製備 G-REX500MCS 培養瓶

判定欲添加至培養瓶之 CM4 的量。記錄每培養瓶添加的細胞體積及 CM4 5000mL-A 的體積。將培養瓶放入 37°C、5% CO₂ 中。

用 TIL 接種培養瓶

【0815】 將細胞產物袋放在分析天平上且記錄將 TIL 添加至 G-REX 培養瓶的時間。均勻混合細胞。重複進行細胞轉移至所有培養瓶。將培養瓶放入 37°C、5% CO₂ 中且記錄將 TIL 添加至 G-REX 培養瓶的時間。向微生物實驗室訂購落菌培養皿測試以及有氧及厭氧無菌性測試。

【0816】 流動式或過量細胞冷凍保存：

【0817】 計算所需之冷凍介質的量：目標細胞濃度為 1×10^8 個/ml；記錄移出之總細胞數。目標細胞濃度為 1×10^8 個細胞/mL。計算欲添加之冷凍介質的總體積。

【0818】 製備冷凍保存介質且放置在 40°C 下直到需要為止。在 20°C 下以 400 x g 離心 TIL 5 min，使用全速煞車及全速加速。抽吸上清液。輕柔拍打管底部以將細胞重懸於剩餘流體中，且當輕柔拍打管時，緩慢添加經製備的冷凍介質。等分至適當大小的已標示冷凍管。放入 -80°C 冷凍器中。在 72 小時內，轉移至永久儲存地點且記載及記錄放入 -80°C 冷凍器中的日期及時間。

實例 6：過程 2A-第 22 天

【0819】此實例描述在實例 3 至 6 中描述之 2A 過程的詳細第 22 天規程。

事前準備

【0820】將三個 1L 袋子的 PlasmaLyte A 放入 BSC 中。製備匯合且標示 PlasmaLyte A 袋子為 1% HSA。裝載 120 mL 的 25% HSA 進行轉移。將 HSA 轉移至 3L PlasmaLyte 袋子。混合均勻。自 3 公升袋子上的無針埠移出 5 mL 的含有 1% HSA 之 PlasmaLyte。標示為 LOVO 洗滌緩衝液及日期。

【0821】IL-2 製備

【0822】自 5 mL 注射器分配 Plasmalyte/1% HSA 至經標示的 50 mL 無菌錐形管。將 0.05 mL IL-2 原液添加至含有 PlasmaLyte 之管且標示 IL-2 6×10^4 。儲存在 2 至 8°C 下。

製備細胞

【0823】自 37°C 移出 G-REX 500M 培養瓶。使用 GatherRex 泵，將第一培養瓶的體積減少。渦流 G-REX 500M 培養瓶直到 TIL 完全重懸，同時避免噴濺或起泡。確定所有細胞皆自膜脫離。傾斜 G-Rex 培養瓶以使細胞懸浮液匯合在收集吸管位處的培養瓶該側。開始 GatherRex 以收集細胞懸浮液且確保自培養瓶移出所有細胞。如果仍有細胞在培養瓶中，則將 100 mL 的上清液回加至培養瓶、渦流且

收集至細胞懸浮液袋子。重複於額外培養瓶。熱封且標示為 LOVO 來源袋。記錄乾重。

【0824】允許 TIL 自細胞懸浮液袋子經由過濾器引流至 LOVO 來源袋。一旦所有細胞皆轉移至 LOVO 來源袋，關閉所有管夾、在緊鄰記號上方熱封且分離。均勻混合袋子且使用二支 3mL 注射器自注射器樣本埠採集 2 個獨立的 2 mL 樣本用於細胞計數及存活性。秤重袋子且判定初始與最終重量之間的差異。記錄資料且放入孵養箱中，包括乾質量。

細胞計數。

【0825】對各樣本執行單細胞計數且記錄資料並將計數原始資料黏貼至批次紀錄。記載細胞計數器計數程式。驗證正確的稀釋輸入細胞計數器中。判定有核細胞總數。判定待移出保留之 TNC 數量 = 1.5×10^{11} 個細胞用於 LOVO 處理。將移出之細胞放入適當大小的容器用於棄置 (disposal)。

LOVO 收集

【0826】事前準備中具有 Baxter 延長組之 10L Labtainer 是接合至 LOVO 套組之置換濾液袋。遵守 LOVO 顯示。要開始程序，自下拉式選單選擇「TIL G-Rex 收集 (TIL G-Rex Harvest)」規程且遵守指示。

【0827】當最終產物體積 (滯留物體積) 螢幕顯示時，

使用來自表 15 之總有核細胞 (TNC) 值，判定下表中之最終產物目標體積 (表 16)。在 LOVO 程序設定期間輸入與該細胞範圍相關之最終產物體積 (mL)。

表 22：判定最終產物目標體積。

細胞範圍	最終產物(滯留物)目標體積(mL)
$0 < \text{總(存活 + 死亡)細胞} \leq 7.1\text{E}10$	150
$7.1\text{E}10 < \text{總(存活 + 死亡)細胞} \leq 1.1\text{E}11$	200
$1.1\text{E}11 < \text{總(存活 + 死亡)細胞} \leq 1.5\text{E}11$	250

表 23：產物目標體積。

總有核細胞 (TNC) $\times 10^6$	最終產物(滯留物)目標體積(mL)

【0828】 要靶向表 16 所指明之體積，輕觸最終產物體積 (mL) 輸入欄位。顯示數字鍵盤。輸入所欲的最終產物體積，單位為 mL。

【0829】 記下所顯示之濾液及溶液 1 (讀為 PlasmaLyte) 的體積。記下所顯示之濾液及溶液 1 (讀為 PlasmaLyte) 的體積。

【0830】 預先包覆 IP 袋子。混合來源袋。在 LOVO 程序期間，系統自動暫停以允許作業者與不同袋子互動。在不同暫停期間顯示不同螢幕。遵守各螢幕對應指示。

來源潤洗暫停

【0831】在引流來源袋後，LOVO添加洗滌緩衝液至來源袋以潤洗袋子。在組態體積的洗滌緩衝液經添加至來源袋後，LOVO自動暫停且顯示來源潤洗暫停(Source Rinse Paused)螢幕。

【0832】LOVO處理來自來源袋的潤洗液，接著繼續自動化程序。

混合IP袋子暫停

【0833】要製備用於另一通過旋轉機之通道的細胞，將IP袋子用洗滌緩衝液稀釋。在添加洗滌緩衝液至IP袋子後，LOVO自動暫停且顯示「混合IP袋子(Mix IP bag)」暫停螢幕。

【0834】當「混合IP袋子(Mix IP bag)」暫停螢幕顯示時，作業者倒轉IP袋子數次以徹底混合細胞懸浮液。遵守指示以恢復LOVO處理來自IP袋子的流體。

按摩IP角落暫停

【0835】在LOVO程序的最終洗滌循環期間，將細胞自IP袋子泵送通過旋轉機至滯留物(最終產物)袋子。當IP袋子清空時，將10 mL洗滌緩衝液添加至IP袋子的底埠以潤洗袋子。在添加潤洗液後，LOVO自動暫停且顯示「按摩IP角落(Message IP corners)」暫停螢幕。

【0836】當「按摩IP角落(Message IP corners)」暫停

螢幕時，作業者按摩袋子角落以將任何殘餘細胞帶入懸浮液中。恢復 LOVO 以將潤洗液自 IP 袋子泵出。

【0837】在 LOVO 程序結束時，顯示移除產物螢幕 (Remove Products Screen)。

【0838】以表 17 的格式記錄結果資料。

表 24：LOVO 結果摘要表。

經過處理時間(括號#)	經過來源處理時間(括號#)	暫停時間	來源體積(mL)	滯留物體積(mL)	濾液體積(mL)	溶液1體積(mL)
A.	B.	C.	D.	E.	F.	G.

【0839】關閉 LOVO 關閉程序

【0840】記錄最終經調配的產物體積。從最終產物表計算所需之 IL-2 的量。

A. 計算最終產物所需之 IL-2 的量。(300 IU/ml 的 IL-2 最終產物)：

最終產物體積(ml) [來自最終經調配的產物體積表之經調配的細胞產物體積] x 300 IU/ml = 所需 IL-2 之 IU

_____ ml X 300 IU = _____ 所需 IL-2 之 IU

B. 所需 IL-2 IU ÷ 在 IL-2 製備步驟中製備之工作原液稀釋(濃度為 6×10^4 IU/mL) = 添加至最終產物之 IL-2 的體積(ml)。

_____ 從上所需 IL-2 之 IU] ÷ 60,000 IU/ml = _____ ml IL-2 工作原液

【0841】判定冷凍袋數量及保留體積

【0842】在以下的目標體積及保留表標示冷凍保存袋的數量及產物滯留樣本體積。

【0843】目標體積/袋子計算：(最終經調配的體積 -

因無法得到100%回收率所作之體積調整=10 mL)/袋子數量。

【0844】用1：1(體積：體積)的CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions)及IL-2製備細胞。

【0845】製備含有IL-2之細胞且連接設備。將細胞及設備放入運輸袋中且放置在2-8°C下 ≤ 15 min。

添加CS10

【0846】抽取在「最終經調配的產物體積(Final Formulated Product Volume)」表中判定的冰冷CS10之量。緩慢且在輕柔混合下將CS10(1：1，體積：體積)添加至細胞。

【0847】添加經調配的細胞產物至冷凍袋

【0848】將注射器置換為適用於待放入各冷凍袋中之細胞體積大小的注射器。混合細胞產物。打開通往細胞產物袋的管夾且抽取適當體積。

記錄最終產物體積

【0849】使用無針埠及適當大小注射器，抽取先前判定的保留量。將保留物放入標示「保留(Retain)」之50 mL錐形管。使用附接至制具的注射器，將所有空氣自袋子移除，抽取細胞至超過袋子進入管路約1”。放置在2至8°C下。混合細胞產物袋中的細胞且剩餘的CS750袋子在活栓上使用新的注射器重複步驟3至8，且使用新的注射器以獲

得細胞保留物。保留物應放在一旁，待產物一放入CRF後即進行處理。

控速冷凍器(CRF)程序(亦見實例16)

【0850】將冷凍器保持在4°C直到準備添加樣本為止。添加樣本至CRF。

【0851】等待直到CRF回到4°C。一旦溫度達到後，遵守CRF程式進行冷凍保存。執行目視檢查冷凍袋下列項目(注意：不檢查過度或不足裝填)：容器完整性、埠完整性、密封完整性、細胞結塊存在及粒子存在。

【0852】將冷凍袋放入預處理的卡匣中且轉移至CRF中。將卡匣平均分布於CRF中的架上。將帶型熱電偶施加在中央卡匣或將虛擬袋(dummy bag)放在中央位置。

【0853】關閉CRF的門。一旦室溫度達到4°C +/-1.5°C。記錄產物轉移至CRF的時間及室溫度。

【0854】處理品管樣本

將下列材料視需要無菌轉移，且根據QC及滯留表25標示。1個細胞計數管、1個內毒素管、1個黴漿菌管、1個革蘭氏染色管、1個再刺激管及1個流動式管進行QC立即測試。將剩餘雙份(duplicate)管放入控速冷凍器。

表 25：測試及儲存指示。

測試	容器
細胞計數及存活性	冷凍小瓶。
黴漿菌	冷凍小瓶儲存在4°C下直到測試完成。
無菌性	接種0.5 mL至厭氧及0.5mL至有氧培養瓶中。
革蘭氏染色	冷凍小瓶儲存在4°C下直到測試完成。
內毒素	冷凍小瓶儲存在4°C下直到測試完成。
流動式	冷凍小瓶儲存在4°C下直到測試完成。
調配後滯留	冷凍保存用於未來測試：由5個衛星小瓶組成，即1個細胞計數管、1個內毒素管、1個黴漿菌管、1個革蘭氏染色管及1個流動式管進行QC立即測試。
再刺激	樣本在室溫下遞送且測定必須在細胞計數結果的30分鐘內開始。

【0855】細胞計數

【0856】對各樣本執行單細胞計數且記錄資料並將計數原始資料黏貼至批次紀錄。記載細胞計數器計數程式。驗證正確的稀釋輸入細胞計數器中。

【0857】冷凍保存調配後滯留細胞：將小瓶放入CRF中。在冷凍完成後移至儲存地點且記錄放入CFR中的日期及時間。記錄移至LN₂的日期及時間。

【0858】微生物測試：訂購有氧及厭氧無菌性測試。

冷凍保存後細胞產物袋

【0859】運行完成後停止冷凍器。將冷凍袋自卡匣移

出。將卡匣轉移至汽相LN2。

實例7：使用IL-2、IL-15及IL-21細胞介素雞尾酒

【0860】此實例描述使用IL-2、IL-15及IL-21細胞介素(彼等作為額外的T細胞生長因子)與實例1至10之TIL過程之組合。

【0861】使用實例1至10之過程，TIL係在實驗的一組中在IL-2存在下生長自結直腸腫瘤、黑色素瘤、子宮頸腫瘤、三陰性乳房腫瘤、肺臟腫瘤及腎臟腫瘤，且在另一組中在培養起始時以IL-2、IL-15及IL-21之組合代替IL-2。在REP前完成時，評估培養的擴增、表型、功能(CD107a+及IFN- γ)及TCR V β 貯庫。IL-15及IL-21係在本文他處及 Grujil, et al., IL-21 promotes the expansion of CD27+CD28+ tumor infiltrating lymphocytes with high cytotoxic potential and low collateral expansion of regulatory T cells, Santegoets, S. J., J Transl Med., 2013, 11:37 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/>)中描述。

【0862】結果顯示相對於僅IL-2條件下，在IL-2、IL-15及IL-21處理條件下觀察到多個組織中的CD4⁺及CD8⁺兩種細胞中之TIL擴增增強(>20%)。相對於僅IL-2培養，獲自IL-2、IL-15及IL-21處理培養之TIL中偏向以富含TCR V β 貯庫之CD8⁺族群為主。相較於僅IL-2處理之TIL，IL-2、IL-15及IL-21處理之TIL中的IFN- γ 及CD107a上升。

實例 8：第 2 期、多中心、三研究世代黑色素瘤研究

【0863】此第 2 期、多中心、三研究世代的研究係設計來評估根據(如本文所述之)過程 1C 製造之 TIL 療法用於轉移性黑色素瘤患者的安全性及療效。研究世代一及二各將收案至多 30 名患者且研究世代三係再治療研究世代，即在至多十名患者進行第二次 TIL 輸注。前二個研究世代評估二種不同的製造過程：過程 1C 及過程 2A 的一實施態樣(分別描述於實例 1 至 10)。研究世代一的患者接受新鮮、非冷凍保存的 TIL 且研究世代二的患者接受經由實例 1 至 10 產製冷凍保存產物描述之過程所製造的產物。研究設計顯示於圖 26。該研究係第 2 期、多中心、三研究世代的研究，評估自體 TIL 用於治療轉移性黑色素瘤患者子族群之安全性及療效。關鍵納入標準包括：可測量的轉移性黑色素瘤及 ≥ 1 個可部分切除用於 TIL 產製之病灶；至少一種現有線上全身性療法；年齡 ≥ 18 ；且 ECOG 體能狀態為 0 至 1。治療研究世代包括非冷凍保存 TIL 產物(使用過程 1C 製備)、冷凍保存的 TIL 產物(使用過程 2A 的一實施態樣製備)及用 TIL 產物再治療無反應或在初始反應後進展的患者。主要終點為安全性且次要終點為療效，定義為客觀反應率(ORR)、完全緩解率(CRR)、無進展存活期(PFS)、反應持續時間(DOR)及整體存活期(OS)。

實例 9：合格化經 γ 照射的周邊單核細胞個別批量

【0864】此實例描述使經 γ 照射的周邊單核細胞(PBMC，亦稱為MNC)個別批量合格的新穎的簡化程序，該等細胞在本文所述之例示性方法用來作為同種異體餵養細胞。

【0865】各批經照射的MNC餵養細胞係自個別供體製備。各批或供體在經純化的抗CD3(克隆OKT3)抗體及介白素2(IL-2)存在下在REP中擴增TIL的能力係經個別篩檢。此外，各批餵養細胞在不添加TIL下測試，以驗證所接受的 γ 輻射劑量足以使彼等複製不能。

背景

【0866】經 γ 照射、生長停頓的MNC餵養細胞係TIL之REP所需。餵養細胞MNC上的膜受體與抗CD3(克隆OKT3)抗體結合且與REP培養瓶中的TIL交聯，刺激TIL擴增。餵養細胞批量係從採自個別供體之全血的白血球分離術製備。將白血球分離術產物進行Ficoll-Hypaque離心、洗滌、照射並在GMP條件下冷凍保存。

【0867】重要的是，接受TIL療法的患者不得輸注存活餵養細胞，因為其可導致移植物抗宿主病(GVHD)。因此餵養細胞藉由接受細胞 γ -照射來使生長停頓，導致雙股DNA斷裂且在再培養時喪失MNC細胞的細胞存活性。

評估標準及實驗設置

【0868】以二個標準評估餵養細胞批量：1)彼等在共

培養中擴增TIL的能力>100倍，及2)彼等之複製不能性。

【0869】 餵養細胞批量在迷你REP格式中利用二個在直立式T25組織培養培養瓶中生長的初代REP前TIL細胞系測試。餵養細胞批量係以二個不同的TIL細胞系測試，其中各TIL細胞系在REP中因應活化而增生的能力不同。一批過去已顯示符合以上標準的經照射的MNC餵養細胞在測試批量旁一起運行作為對照組。

【0870】 為了確保所有單一實驗中的測試批量接受等效測試，相同REP前TIL細胞系的足夠原液可用於測試所有條件及所有餵養細胞批量。

【0871】 每批測試的餵養細胞總共有六個T25培養瓶：REP前TIL細胞系#1(2個培養瓶)；REP前TIL細胞系#2(2個培養瓶)；及餵養細胞對照組(2個培養瓶)。評估含有TIL細胞系#1及#2的培養瓶中之餵養細胞批量擴增TIL的能力。評估餵養細胞對照組培養瓶中之餵養細胞批量的複製不能性。

實驗規程

第-2/3天，解凍TIL細胞系

【0872】 製備CM2介質。在37°C水浴中溫熱CM2。製備40 ml的補充有3000IU/ml IL-2之CM2。保持溫熱直到使用。將20 ml不含IL-2的預熱CM2放入二個標示有所使用的TIL細胞系名稱之50ml錐形管中之各者。自LN2儲存移出二個指定的REP前TIL細胞系並將小瓶轉移至組織培養

室。將小瓶放在密封夾鏈儲存袋中在37°C水浴中解凍，直到剩下少量的冰。

【0873】 使用無菌移液吸管，立即將小瓶內容物轉移至經製備、標示的50ml錐形管中的20ml CM2中。使用不含IL-2的CM2補足至40ml以洗滌細胞。在400 x CF下離心5分鐘。抽吸上清液並重懸於補充有3000 IU/ml IL-2之5ml溫熱CM2中。

【0874】 移出雙份小等分試樣(20 μ l)，使用自動細胞計數器進行細胞計數。記錄計數。當計數時，將含有TIL細胞的50ml錐形管放入增濕37°C、5% CO₂孵養箱中，且將蓋子鬆開以允許氣體交換。判定細胞濃度並將TIL稀釋至1 \times 10⁶個細胞/ml於補充有3000 IU/ml IL-2之CM2中。

【0875】 在增濕37°C孵養箱中視需要培養於24孔組織培養盤中盡可能多孔的2ml/孔中直到迷你REP的第0天。在分開的24孔組織培養盤上培養不同的TIL細胞系，以避免混淆及可能的交叉污染。

第0天，起始迷你REP

【0876】 為欲測試的餵養細胞批量數製備足夠的CM2介質。(例如為了一次測試4批餵養細胞，製備800ml的CM2介質)。取等分試樣的一部分上述製備之CM2並補充3000 IU/ml IL-2以用於培養細胞。(例如為了一次測試4批餵養細胞，製備500ml的含3000 IU/ml IL-2之CM2介質)。

【0877】 分開處理各TIL細胞系以預防交叉污染，自

孵養箱移出有TIL培養的24孔板且轉移至BSC。

【0878】使用無菌移液吸管或100至1000 μ l吸量管及吸管尖，自所欲使用的TIL各孔移出約1ml的介質並放入24孔組織培養盤之未使用孔中。

【0879】使用新的無菌移液吸管或100至1000 μ l吸量管及吸管尖，將剩餘介質與TIL在孔中混合以重懸細胞，接著將細胞懸浮液轉移至標示TIL名稱且記錄體積的50ml錐形管中。

【0880】用儲備介質洗滌孔，並將該體積轉移至相同的50ml錐形管。將細胞在400 x CF下離心以收集細胞團塊。抽吸掉介質上清液並將細胞團塊重懸於含有3000 IU/ml IL-2之2-5ml的CM2介質中，所欲使用的體積基於收集的孔數及團塊大小而定，該體積應足以確保 $>1.3 \times 10^6$ 個細胞/ml的濃度。

【0881】使用血清吸管，將細胞懸浮液徹底混合並記錄體積。移出200 μ l，使用自動細胞計數器進行細胞計數。當計數時，將含有TIL細胞的50ml錐形管放入增濕、5% CO₂、37°C 孵養箱中，且將蓋子鬆開以允許氣體交換。記錄計數。

【0882】自孵養箱移出含有TIL細胞之50ml錐形管，並將細胞以 1.3×10^6 個細胞/ml之濃度重懸於補充有3000 IU/ml IL-2之溫熱CM2中。將50ml錐形管放回孵養箱，蓋子鬆開。

【0883】第二TIL細胞系重複以上步驟。

【0884】在將TIL接種至T25培養瓶進行實驗之前，將TIL如以下所示稀釋1:10以達 1.3×10^5 個細胞/ml之最終濃度。

製備MACS GMP CD3純(OKT3)工作溶液

【0885】自4°C冰箱取出OKT3儲備溶液(1mg/ml)並放在BSC中。在迷你REP的介質中使用最終濃度30ng/ml的OKT3。

【0886】在實驗的各T25培養瓶中，20ml需要600ng的OKT3；此相當於每20ml需要60 μ l的10 μ g/ml溶液，或每批餵養細胞的所有6個測試培養瓶需要360 μ l。

【0887】就每批測試的餵養細胞而言，製備400 μ l的1mg/ml OKT3之1:100稀釋液，工作濃度為10 μ g/ml(例如為了一次測試4批餵養細胞，製備1600 μ l的1mg/ml OKT3之1:100稀釋液：16 μ l的1mg/ml OKT3+1.584ml的含3000 IU/ml IL-2之CM2介質)。

製備T25培養瓶

【0888】在製備餵養細胞之前，標示各培養瓶並用CM2介質填充培養瓶。將培養瓶放入37°C增濕5% CO₂孵養箱以保持介質溫熱，等待添加剩餘組分。一旦餵養細胞製備好，將組分添加至各培養瓶中的CM2中。

加上3000 IU/ml IL-2中。將TIL細胞自 1.3×10^6 個細胞/ml稀釋至 1.3×10^5 個細胞/ml。

設置共培養

【0893】將TIL細胞自 1.3×10^6 個細胞/ml稀釋至 1.3×10^5 個細胞/ml。添加4.5ml的CM2介質至15ml錐形管。自孵養箱移出TIL細胞並使用10ml血清吸管重懸均勻。自 1.3×10^6 個細胞/ml TIL懸浮液移出0.5ml的細胞並添加至15ml錐形管中4.5ml的介質。將TIL原液小瓶放回孵養箱。混合均勻。第二TIL細胞系重複進行。

將含有預熱介質之單一餵養細胞批量培養瓶從孵養箱轉移至BSC。用1ml吸管尖吸放混合餵養細胞數次並轉移1ml(1.3×10^7 細胞)的餵養細胞批量至各培養瓶。添加60 μ l的OKT3工作原液(10 μ g/ml)至各培養瓶。將二個對照培養瓶放回孵養箱。

【0894】將1 ml (1.3×10^5)的各TIL批量轉移至對應標示的T25培養瓶。將培養瓶放回孵養箱並直立孵養。不要擾動直到第5天。

【0895】重複進行於所有測試的餵養細胞批量。

第5天，介質更換

製備含3000 IU/ml IL-2之CM2。各培養瓶需要10ml。使用10ml吸量管，將含3000 IU/ml IL-2的10ml溫熱CM2轉移至各培養瓶。將培養瓶放回孵養箱並直立孵養直到第7

天。重複進行於所有測試的餵養細胞批量。

第7天，收集

【0896】自孵養箱移出培養瓶並轉移至BSC，小心不擾動培養瓶底部的細胞層。在不擾動生長在培養瓶底部的細胞下，從各測試培養瓶移出10ml的介質且從各對照組培養瓶移出15ml的介質。

【0897】使用10ml血清吸管，將細胞重懸於剩餘介質中並混合均勻以打斷任何細胞結塊。在藉由吸量管吸放徹底混合細胞懸浮液之後，移出200 μ l進行細胞計數。使用適當標準作業程序搭配自動化細胞計數器設備計數TIL。在第7天記錄計數。

【0898】重複進行於所有測試的餵養細胞批量。

【0899】根據下表TT，評估餵養細胞對照組培養瓶中之複製不能性及評估含有TIL之培養瓶自第0天的擴增倍數。

第7天，持續餵養細胞對照組培養瓶至第14天

【0900】在完成餵養細胞對照組培養瓶的第7天計數後，添加含有3000 IU/ml IL-2之15ml的新鮮CM2介質至各對照組培養瓶。將對照組培養瓶放回孵養箱並以直立位置孵養直到第14天。

第14天，餵養細胞對照組培養瓶的延長不增生

【0901】自孵養箱移出培養瓶並轉移至BSC，小心不擾動培養瓶底部的細胞層。在不擾動生長在培養瓶底部的細胞下，從各對照組培養瓶移出大約17ml的介質。使用5ml血清吸管，將細胞重懸於剩餘介質中並混合均勻以打斷任何細胞結塊。記錄各培養瓶的體積。

【0902】在藉由吸量管吸放徹底混合細胞懸浮液之後，移出200 μ l進行細胞計數。使用適當標準作業程序搭配自動化細胞計數器設備計數TIL。記錄計數。

【0903】重複進行於所有測試的餵養細胞批量。

結果及接受標準

結果

【0904】 γ 照射的劑量足以使餵養細胞複製不能。預期所有批量皆符合評估標準，且亦證實REP培養第7天剩餘的餵養細胞總存活數量相較於第0天減少。

【0905】預期所有餵養細胞批量到REP培養第7天皆符合TIL生長100倍擴增之評估標準。

【0906】預期餵養細胞對照組培養瓶的第14天計數持續第7天所見之不增生趨勢。

接受標準

【0907】每批餵養細胞測試的每個複製TIL細胞系皆符合下列接受標準。

【0908】接受如下為兩面向(如下表27所概述)。

衛星測試小瓶，則該批量根據上列接受標準為失敗。

【0914】 為了合格，有問題的批量及對照組批量必須達成上述接受標準。符合這些標準後，該批量才可放行提供使用。

實例 10：合格化經 γ 照射的周邊血液單核細胞個別批量

【0915】 此實例描述使經 γ 照射的周邊血液單核細胞(PBMC)個別批量合格的新穎的簡化程序，該等細胞在本文所述之例示性方法用來作為同種異體餵養細胞。此實例提供評估用於產生TIL臨床批量之經照射的PBMC細胞批量之規程。各批經照射的PBMC係自個別供體製備。在超過100個合格化規程期間，顯示在所有情況下，來自SDBB(San Diego Blood Bank)之經照射的PBMC批量在REP第7天擴增TIL >100倍。此經改良的合格化規程意圖用於來自SDBB之經照射的供體PBMC批量，該等批量接著經過進一步測試以驗證接受 γ 輻射劑量足以使彼等複製不能。一旦證實彼等在14天期間維持複製不能，即認為供體PBMC批量「合格」，可用於產生TIL臨床批量。

背景

【0916】 經 γ 照射、生長停頓的PBMC係目前TIL之標準REP所需。PBMC上的膜受體與抗CD3(克隆OKT3)抗體結合且與培養中的TIL交聯，刺激TIL擴增。PBMC批量係從採自個別供體之全血的白血球分離術製備。將白血球分

離術產物進行Ficoll-Hypaque離心、洗滌、照射並在GMP條件下冷凍保存。

【0917】重要的是，接受TIL療法的患者不得輸注存活PBMC，因為其可導致移植物抗宿主病(GVHD)。因此供體PBMC藉由接受細胞 γ -照射來使生長停頓，導致雙股DNA斷裂且在再培養時喪失PBMC的細胞存活性。

評估標準

【0918】經照射的PBMC批量之複製不能性的評估標準。

實驗設置

【0919】餵養細胞批量在迷你REP格式中如同彼等將與TIL共培養般測試，使用直立式T25組織培養培養瓶。對照組批量：一批過去已顯示符合以上標準的經照射的PBMC在實驗批量旁一起運行作為對照組。每批測試的經照射的供體PBMC皆以雙份培養瓶運行。

實驗方案

第0天

【0920】為欲測試的每批供體PBMC製備約90ml的CM2介質。將CM2於37°C水浴中保持溫熱。解凍等分試樣的 6×10^6 IU/ml IL-2。將CM2介質放回BSC，在放入通風櫥之前用70% EtOH擦拭。就每批測試的PBMC而言，移出約

60ml的CM2至分開的無菌瓶。添加解凍的 6×10^6 IU/ml IL-2 儲備溶液至此介質以達3000 IU/ml之最終濃度。將此瓶標示為「CM2/IL2」(或類似用語)以與未經補充的CM2區別。

製備OKT3

【0921】自4°C冰箱取出抗CD3 (OKT3)儲備溶液並放在BSC中。在迷你REP的介質中使用最終濃度30ng/ml的OKT3。從1mg/ml儲備溶液製備10 μ g/ml的抗CD3 (OKT3)工作溶液。放在冰箱中直到需要為止。

【0922】就每批測試的PBMC而言，製備150 μ l的抗CD3 (OKT3)原液之1:100稀釋液。例如，為了一次測試4批PBMC，添加6 μ l的1mg/ml儲備溶液至594 μ l的補充有3000 IU/ml IL-2之CM2，製備600 μ l的10 μ g/ml抗CD3 (OKT3)。

製備培養瓶

【0923】添加每培養瓶19ml的CM2/IL-2至經標示的T25培養瓶，並將培養瓶放入37°C、增濕、5% CO₂孵養箱中，同時製備細胞。

製備照射的PBMC

【0924】自LN2儲存取出欲測試的PBMC批量小瓶。在解凍之前將其等放在-80°C下或保持在乾冰上。對於每

個欲解凍的批量，將 30ml 的 CM2(不含 IL-2 補充物)放入 50ml 錐形管。在各管標示欲解凍的 PBMC 之不同批號。在使用前將管的蓋子蓋緊並放入 37°C 水浴中。視需要，將 50 ml 錐形管放回 BSC，在放入通風櫥之前用 70% EtOH 擦拭。

【0925】自冷藏移出 PBMC 小瓶並放入在 37°C 水浴中之漂浮式管架以解凍。允許解凍進行，直到小瓶中剩下少量的冰。使用無菌移液吸管，立即將小瓶內容物轉移至 50 ml 錐形管中的 30ml CM2 中。自管中移出約 1ml 的介質以潤洗小瓶；將潤洗液放回 50ml 錐形管中。將蓋子蓋緊並輕柔渦漩以洗滌細胞。

【0926】在 400 x g 下在室溫下離心 5min。使用 1000 μ l 吸管尖抽吸上清液並將細胞團塊重懸於 1ml 的溫熱 CM2/IL-2 中。替代地，在添加介質之前，藉由將加蓋管沿著空管架拖行使細胞團塊重懸。在重懸細胞團塊之後，使用 CM2/IL-2 介質將體積加至 4ml。記錄體積。

【0927】移出小等分試樣(例如 100 μ l)，使用自動細胞計數器進行細胞計數。根據特定自動細胞計數器 SOP，執行雙份計數。極有可能必須在執行細胞計數之前執行 PBMC 稀釋。建議起始稀釋為 1：10，但此將視所使用的細胞計數器類型而異。記錄計數。

【0928】使用 CM2/IL-2 介質，將 PBMC 濃度調整至 1.3 $\times 10^7$ 個細胞/ml。藉由輕柔渦漩或藉由使用血清吸管輕柔上下抽吸來混合均勻。

設置培養瓶

【0929】將二個經標示的 T25 培養瓶從組織培養孵養箱放回 BSC。將 10 μ g/ml 小瓶的抗 CD3/OKT3 放回 BSC。添加 1ml 的 1.3 \times 10⁷ PBMC 細胞懸浮液至各培養瓶。添加 60 μ l 的 10 μ g/ml 抗 CD3/OKT3 至各培養瓶。將加蓋培養瓶放回組織培養孵養箱，在不擾動下生長 14 天。將抗 CD3/OKT3 小瓶放回冰箱中，直到下一批需要為止。重複於欲評估的各批 PBMC。

第 14 天，測量 PBMC 的不增生

【0930】將雙份 T25 培養瓶放回 BSC。對於各培養瓶，使用新的 10ml 血清吸管，自每個培養瓶移出約 17ml，接著小心抽起剩餘介質以測量培養瓶中剩餘的體積。記錄體積。

【0931】使用同一支血清吸管上下吸放，均勻混合樣本。

【0932】自各培養瓶移出 200 μ l 樣本進行計數。使用自動細胞計數器計數細胞。重複步驟 7.4.26 至 7.4.31，評估每批 PBMC。

結果及接受標準

結果

【0933】預期 γ 照射的劑量足以使餵養細胞複製不能。預期所有批量皆符合評估標準，證實 REP 培養第 14 天

剩餘的餵養細胞總存活數量相較於第0天減少。

接受標準

【0934】 每批測試的經照射的供體 PBMC 皆符合下列接受標準：「無生長」，表示第14天存活細胞總數小於在 REP 的第0天放入培養中的初始存活細胞數量。

不符合接受標準的 PBMC 批量之列聯測試。

【0935】 如果經照射的供體 PBMC 批量不符合上述接受標準，採取下列步驟重新測試批量以排除簡單實驗誤差為其失敗原因。如果該批量有二或更多個剩餘衛星小瓶，則將該批量重新測試。如果該批量有一個或沒有剩餘衛星小瓶，則該批量根據上述接受標準為失敗。

【0936】 為了合格，進行列聯測試的 PBMC 批量中的兩個對照組批量及兩個有問題的批量複製皆需達成接受標準。符合此標準後，該批量才可放行提供使用。

實例 11：製備 IL-2 儲備溶液

【0937】 此實例描述將經純化、冷凍乾燥的重組人介白素-2 溶解成適用於進一步組織培養規程之原液樣本的過程，包括所有該些於本申請案及實例所述者，包括該些涉及使用 rhIL-2 者。

程序

【0938】製備0.2%乙酸溶液(HAc)。將29mL無菌水轉移至50ml錐形管。添加1mL 1N乙酸至50ml錐形管。倒轉管2至3次以混合均勻。將HAc溶液藉由使用Steriflip過濾器過濾滅菌。

【0939】製備含1% HSA的PBS。添加4mL的25% HSA儲備溶液至於150mL無菌過濾器單位中之96mL PBS。過濾溶液。儲存在4°C下。對於所製備的各小瓶rhIL-2，填寫表格。

【0940】製備rhIL-2儲備溶液(6×10^6 IU/mL最終濃度)。每批rhIL-2皆不同且需要廠商檢驗證明書(COA)中提供的資訊，諸如：1)rhIL-2的每小瓶質量(mg)、2)rhIL-2的比活性(IU/mg)及3)建議0.2% HAc重構體積(mL)。

【0941】使用以下公式計算rhIL-2批量所需的1% HSA體積：

$$\left(\frac{\text{小瓶質量 (mg)} \times \text{生物活性} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - \text{HAc vol (mL)} = 1\% \text{ HSA vol (mL)}$$

【0942】例如，根據CellGenix的rhIL-2批量10200121 COA，1mg小瓶的比活性為 25×10^6 IU/mg。建議將rhIL-2重構於2mL 0.2% HAc中。

$$\left(\frac{1 \text{mg} \times 25 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mg}}}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - 2 \text{mL} = 2.167 \text{mL HSA}$$

【0943】用酒精棉擦拭IL-2小瓶的橡膠瓶塞。使用附

接至3mL注射器的16G針頭，注射建議體積的0.2% HAc至小瓶中。在抽出針頭時，小心不要使瓶塞脫出。倒轉小瓶3次且渦漩直到所有粉末溶解。小心移除瓶塞且放在一旁的酒精棉上。添加經計算體積的1% HSA至小瓶。

【0944】儲存rhIL-2溶液。短期儲存時(<72hrs)，將小瓶儲存在4°C下。長期儲存時(>72hrs)，將小瓶等分成更小體積且儲存在-20°C冷凍小瓶中，直到準備使用為止。避免冷凍/解凍循環。製備日期後6個月到期。Rh-IL-2標籤包括供應商及目錄編號、批號、到期日、作業者首字母、等分試樣的濃度及體積。

實例12：製備用於REP前及REP過程的介質

【0945】此實例描述用於製備組織培養基之程序，該等組織培養基使用於涉及衍生自各種腫瘤類型包括但不限於轉移性黑色素瘤、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)、卵巢癌、三陰性乳癌及肺腺癌的腫瘤浸潤淋巴球(TIL)培養之規程。此介質可用於製備本申請案及實例中所述之任何TIL。

CM1之製備

【0946】將下列試劑移出冷藏並使彼等在37°C水浴中溫熱：(RPMI1640、人AB血清、200mM L-麩醯胺酸)。根據下表28，藉由添加各成分至所欲過濾之體積適當的0.2um過濾器單位的頂部，製備CM1介質。儲存在4°C下。

表 28：CM1之製備

成分	最終濃度	最終體積500 ml	最終體積1L
RPMI1640	NA	450 ml	900 ml
人AB血清， 熱失活10%	50 ml	100 ml	
200mM L- 麩胺醯胺	2 mM	5 ml	10 ml
55mM BME	55 μ M	0.5 ml	1 ml
50mg/ml 硫酸建 它黴素	50 μ g/ml	0.5 ml	1 ml

【0947】 在使用當天，在 37°C 水浴中預溫熱所需量的 CM1 並添加 6000 IU/ml IL-2。

【0948】 額外補充 - 根據表 29 如需要補充。

表 29：CM1 之如需要的額外補充。

補充物	原液濃度	稀釋	最終濃度
GlutaMAX™	200mM	1:100	2mM
青黴素/鏈黴素	10,000 U/ml 青黴素 10,000 μ g/ml 鏈黴素	1:100	100 U/ml 青黴素 100 μ g/ml 鏈黴素
兩性黴素B	250 μ g/ml	1:100	2.5 μ g/ml

CM2 之製備

【0949】 將製備好的 CM1 自冰箱移出或如上 7.3 節所示製備新鮮 CM1。自冰箱移出 AIM-V®，將製備好的 CM1 與等體積的 AIM-V® 在無菌介質瓶中混合來製備所需量的 CM2。在使用當天添加 3000 IU/ml IL-2 至 CM2 介質。在使用當天做足量的含 3000 IU/ml IL-2 之 CM2。將 CM2 介質瓶標示名稱、製備者首字母、過濾/製備日期、二週到期日並儲存在 4°C 下直到需要用於組織培養為止。

CM3之製備

【0950】在需要使用的當天製備CM3。CM3與AIM-V®介質相同，在使用當天補充3000 IU/ml IL-2。藉由直接添加IL-2儲備溶液至AIM-V的瓶或袋中，製備足夠實驗需要的CM3量。藉由溫和震盪混合均勻。在添加至AIM-V後，立即在瓶上標示「3000 IU/ml IL-2」。如果有過量的CM3，將其儲存在瓶中在4°C下，並標示介質名稱、製備者首字母、介質製備日期及其到期日(製備後7天)。補充有IL-2之介質在4°C下儲存7天後丟棄。

CM4之製備

【0951】CM4與CM3相同，但具有額外的2mM GlutaMAX™(最終濃度)補充物。在每1L的CM3中添加10ml的200mM GlutaMAX™。藉由直接添加IL-2儲備溶液及GlutaMAX™儲備溶液至AIM-V的瓶或袋中，製備足夠實驗需要的CM4量。藉由溫和震盪混合均勻。在添加至AIM-V後，立即在瓶上標示「3000 IU/ml IL-2 and GlutaMAX」。如果有過量的CM4，將其儲存在瓶中在4°C下，並標示介質名稱、「GlutaMAX」及其到期日(製備後7天)。補充有IL-2之介質在4°C下儲存7天後丟棄。

【0952】

實例13：評估用於2A過程之無血清介質

【0953】此實例提供資料顯示以無血清介質置換目前2A過程所使用之標準CM1、CM2及CM4介質的有效性評

估。本研究測試可用之無血清介質(SFM)及無血清替代物在三期中作為置換的有效性；

【0954】第1期：比較使用標準相較於無論有無血清置換或血小板溶解物之CTS Optimizer或Prime T CDM或Xvivo-20無血清介質在TIL擴增(n=3)上的有效性。

【0955】第2期：在迷你規模2A過程中使用G-Rex 5M測試候選無血清介質條件(n=3)。

背景資訊

【0956】雖然目前用於REP前及後培養的介質組合已證實有效，但REP失敗可發生於AIM-V。如果識別出有效的無血清替代物，藉由將所使用之介質類型數量從3種減少成1種，將可使過程更為直接且易於在CMO中執行。此外，SFM藉由清除人血清的使用而減少意外疾病的機會。此實例提供資料顯示支持在2A過程中使用無血清介質。

【0959】步驟1。選擇無血清介質供應商。設置REP前及REP後以在G-Rex 24孔板中模擬2A過程。REP前係藉由每條件三重複或四重複培養各片段/G-Rex 24孔板之孔起始。REP係在第11天藉由培養 4×10^5 個TIL/G-Rex 24孔板之孔起始、在第16天分瓶、在第22天收集。使用CTS OpTimizer、X-Vivo 20及Prime T-CDM作為REP前及REP中使用的潛在無血清介質替代物。CTS Immune SR血清置換(Life Technologies)或血小板溶解物血清(SDBB)以3%添加至SFM。計畫用至少3種腫瘤於REP前及REP後測試各條件以模擬2A過程。

【0960】步驟2。經識別的候選物進一步按照規程(TP-17-007)以迷你規模2A過程測試。簡言之，REP前係藉由每條件三重複培養2個片段/G-Rex 5M培養瓶起始。REP係在第11天使用 2×10^6 /G-Rex 5M培養瓶起始、在第16天分瓶、在第22天收集。

【0961】注意：一些腫瘤係經處理及設置以在一個實驗中測量多個參數

觀察

【0962】當比較無血清介質與2A過程所使用之標準時，觀察細胞生長之等效或統計較佳結果

【0963】當與生長於2A過程所使用之標準介質中的TIL比較時，觀察生長於無血清介質中的TIL之類似表型、IFN- γ 產生及代謝物分析。

結果

在 REP 前及後 TIL 擴增測試無血清介質的有效性。

【0964】 CTS Optimizer + SR(血清置換)顯示增強 REP 前 TIL 擴增及可相比的 REP TIL 擴增。經 3% CTS Immune CTS SR 添加或不添加之 CTS OpTimizer、X-Vivo 20 及 Prime T-CDM 係相較於標準條件測試。在 M1079 及 L4026 中，當與標準條件 (CM1、CM2、CM4) 比較時，CTS OpTimizer + CSR 條件顯示顯著增強的 REP 前 TIL 擴增 ($p < 0.05$)。相反地，無添加 CSR 之 CTS Optimizer 不幫助 REP 前 TIL 擴增 (附件 1、2、3)。在 3 種測試腫瘤中的二種，CTS Optimizer + CSR 在 REP 後顯示可相比的 TIL 擴增 (圖 2B)。X-Vivo 20 及 Prime T-CDM 條件在 REP 前及後中發生大量變異，然而 CTS Optimizer 在四重複之間相對一致。此外，當與標準比較時，SFM 添加血小板溶解物不增強 REP 前及 REP 後 TIL 擴增。此發現暗示血清置換是提供與我們的標準可相比生長所必然需要的，CTS optimizer + CSR 可為候選物。

【0965】 在 G-Rex 5M mini 中測試候選條件。

【0966】 REP 後 TIL 的表型分析。見下表 31。

表 31：CTS OpTimizer之CD8偏移

	平均 %CD8+	
	標準	CTS
M1078	11	34
M1079	29.3	43.85
M1080	33.67	54.37
L4020	0.02	0.17
EP11020	28.67	25.07
L4030	0.13	0.09
L4026	9.45	34.06
M1092	5.75	52.47
T6030	66	52.6

【0967】 干擾素- γ 可相比性

【0968】 干擾素- γ ELISA (Quantikine)。IFN- γ 的產生使用R&D系統的Quantikine ELISA套組測量。當與我們的標準條件比較時，CTS+SR產生可相比的IFN- γ 量。

實例 14：T細胞生長因子雞尾酒 IL-2/IL-15/IL-21增強腫瘤浸潤T細胞的擴增及效應功能

【0969】 自體腫瘤浸潤淋巴球(TIL)的過繼性T細胞療法已在轉移性黑色素瘤及子宮頸癌患者證實臨床療效。在一些研究中，較佳的臨床結果與輸注細胞總數及/或CD8+ T細胞百分比有正向相關。大部分目前的產生方案僅利用IL-2來促進TIL生長。使用含有IL-15及IL-21之方案已報告增強淋巴球擴增。本研究描述添加IL-15及IL-21至最近在

臨床施行之第二代IL-2-TIL規程的正面效應。

材料及方法

【0970】產生TIL之過程包括快速擴增規程前(REP前)，其中1至3 mm³ 大小的腫瘤片段放在含有IL-2之介質中。在REP前期間，TIL游出(emigrate out)腫瘤片段且因應IL-2刺激而擴增。

【0971】為了進一步刺激TIL生長，TIL經過稱為快速擴增規程(REP)之繼代培養期間擴增，該規程包括經照射的PBMC餵養細胞、IL-2及抗CD3。在本研究中，開發了縮短的REP前及REP擴增規程來擴增TIL，同時維持最終TIL產物的表型及功能屬性。

【0972】此縮短的TIL產生規程係用於評估僅IL-2相較於IL2/IL-15/IL-21之組合的影響。比較這兩種培養方案在生長自結直腸腫瘤、黑色素瘤、子宮頸腫瘤、三陰性乳房腫瘤、肺腫瘤及腎腫瘤的TIL之產生。在REP前完成時，評估培養TIL的擴增、表型、功能(CD107a+及IFN γ)及TCR V β 貯庫。

【0973】REP前培養使用標準IL-2 (600 IU/ml)規程或除IL-2之外還添加IL-15 (180 IU/ml)及IL-21 (IU/ml)起始。在REP前完成時評估細胞的擴增。如果整體生長增強至少20%，則將培養分類為比IL-2具有增加的擴增。在本文中呈現黑色素瘤及肺表型及功能研究。見下表32。

表 32：在多個適應症中在具有IL-2/IL-15/IL-21之REP前期間之擴增的增強

腫瘤組織學	IL-2相較於 IL-2/IL-15/IL-21 研究的數量	證實使用IL-2/IL-15/IL-21 (相較於IL-2)>20%生長增 強的研究數量
黑色素瘤	5	1/5(20%)
肺臟	8	3/8 (38%)
結直腸	11	7/11 (63%)
子宮頸	1	1/1 (100%)
胰	2	2/2 (100%)
神經膠質母細胞瘤	1	1/1 (100%)
三陰性乳房	1	1/2 (50%)

【0974】這些資料證實當TIL與IL-2/IL15/IL-21相較於僅IL-2培養時，除了在肺的表型及功能差異之外，TIL產物的產率增加。

【0975】三重雞尾酒對TIL擴增的效應為適應症特異性且最有益於低產率腫瘤。

【0976】NSCLC TIL產物處理增加CD8+/CD4+ T細胞比例。

【0977】T細胞活性似乎藉由添加IL-15及IL-21至IL-2來增強，如藉由黑色素瘤及NSCLC中之CD107a表現水準所評估。

【0978】此處提供之資料顯示使用較短、更強健的過程(諸如本說明書此處及其他實例所述之2A過程)的TIL擴

增可經調適以涵蓋IL-2/IL-15/IL-21細胞介素雞尾酒，藉此提供進一步特別是在特定適應症中促進TIL擴增的手段。

【0979】持續進行中的實驗正進一步評估IL-2/IL-15/IL-21對TIL功能的效應。

【0980】額外實驗將評估三重雞尾酒在REP(第一擴增)期間的效應。

【0981】這些觀察對於優化及標準化大規模製造TIL所需的TIL培養方案特別重要，具有主流抗癌症療法需要的廣泛應用性及可用性。

實例15：評估100:1至25:1之同種異體餵養細胞細胞:TIL比例範圍

【0982】本研究測試以25:1及50:1同種異體餵養細胞對TIL相較於目前在過程1C中利用的100:1對照組之TIL的增生。

【0983】美國國家癌症研究所(National Cancer Institute)手術部門發表的研究顯示在G-Rex 100培養瓶中TIL之最佳活化臨限為REP起始時每 cm^2 5×10^6 個同種異體餵養細胞⁽¹⁾。此已經由數學模型驗證且相同模型預測使用經細胞：每單位面積細胞接觸優化的餵養細胞層，同種異體餵養細胞相對於TIL之比例可降低至25:1而極小影響TIL活化及擴增。

【0984】本研究建立在REP開始時每單位面積餵養細胞的最佳密度，且驗證在REP起始時需要的同種異體餵養

細胞比例之有效範圍以降低及標準化每臨床批量所使用之
 餵養細胞的量。該研究亦驗證以小於 200×10^6 個 TIL 與固定
 數量的餵養細胞共培養起始 REP。

【0985】 A. T細胞體積(直徑 $10 \mu\text{m}$) : $V = (4/3)\pi r^3 = 523.6 \mu\text{m}^3$

【0986】 B. 具有 $40 \mu\text{m}$ (4個細胞)高度之 G-Rex 100 (M)
 體積 : $V = (4/3)\pi r^3 = 4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3$

【0987】 C. 需要填滿 B 體積的細胞數量 : $4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3 /$
 $523.6 \mu\text{m}^3 = 7.6 \times 10^8 \mu\text{m}^3 * 0.64 = 4.86 \times 10^8$

【0988】 D. 可在 4D 空間中被最佳活化的細胞數量 :
 $4.86 \times 10^8 / 24 = 20.25 \times 10^6$

【0989】 E. 外推至 G-Rex 500 之餵養細胞及 TIL 數量 :
 TIL : 100×10^6 及 餵養細胞 : 2.5×10^9

【0990】 算式 1。在具有 100 cm^2 基底的圓柱體中提供
 TIL 活化之二十面體幾何學所需的單核細胞近似數量。計
 算得到約 5×10^8 的實驗結果為 T 細胞活化臨限，其密切反映
 NCI 實驗資料。(1)(C) 乘數 (0.64) 是如 Jaeger 及 Nagel 在 1992
 年計算的當量球體隨機填充密度(2)。(D) 除數 24 是 4 維空間
 中可接觸類似物體的當量球體數量「牛頓數」(3)。

參考文獻

【0991】 (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。

【0992】⁽²⁾ Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20; 255(5051): 1523-31。

【0993】⁽³⁾ O. R. Musin (2003). "The problem of the twenty-five spheres". Russ. Math. Surv. 58 (4): 794-795。

實例 16：使用密閉系統產生冷凍保存 TIL 細胞療法

【0994】此實例描述 Iovance Biotherapeutics, Inc. 根據現行人體細胞組織優良操作規範及現行藥品優良製造規範 cGMP 製造在 G-Rex 培養瓶中之 TIL 細胞療法過程。此材料將依照 US FDA 藥品優良製造規範法規 (21 CFR 第 210、211、1270 及 1271 部分) 製造，第 I 期至商用材料適用 ICH Q7 標準。

【0995】過程摘要提供於下表 33。

表 33：過程摘要

預估天數 (接種後)	活動	目標標準	預期容器	預估總 體積(mL)
0	腫瘤分割	每個 G-Rex100MCS 中 ≤ 50 個所欲腫瘤片段	G-Rex100MCS 1 個培養瓶	≤ 1000
11	REP 接種	每個 G-Rex500MCS 中 5 至 200×10^6 個存活細胞	G-Rex500MCS 1 個培養瓶	≤ 5000
16	REP 分瓶	每個 G-Rex500MCS 中 1×10^9 個存活細胞	G-Rex500MCS ≤ 5 個培養瓶	≤ 25000
22	收集	總可用細胞	3 至 4 個 CS-750 袋子	≤ 530

【0996】在此實例中，假設 $1.0 \text{ mL/L} = 1.0 \text{ g/kg}$ ，除非另外指明。一旦打開後，下列到期日適用於 2°C 至 8°C 下：人血清 AB 型 (HI) Gemini，1 個月；2-巰乙醇，1 個月。硫酸

建它黴素 50mg/ml 原液可在室溫下保持 1 個月。含有 10L 的 AIM-V 介質之袋子僅可在使用前至多 24 小時在室溫下溫熱一次。在第 22 天收集期間，可使用二個 Gatherex™ 收集來自 G-Rex500MCS 培養瓶的 TIL。

第 0 天 CM1 介質製備

【0997】 製備 RPMI 1640 介質。在 BSC 中，使用適當大小的吸量管，自 1000 mL RPMI 1640 介質中移出 100.0 mL 並放入標示「廢棄物」的適當大小容器。

【0998】 在 BSC 中，添加試劑至 RPMI 1640 介質瓶。添加表中顯示之下列試劑至 RPMI 1640 介質瓶。記錄添加的體積。每瓶添加的量：熱去活化人類 AB 血清 (100.0 mL)；GlutaMax (10.0 mL)；硫酸建它黴素 50 mg/mL (1.0 mL)；2-巰乙醇 (1.0 mL)

【0999】 將 RPMI 1640 介質瓶加蓋並將瓶渦漩以確保試劑混合徹底。將來自步驟 8.1.6 的 RPMI 1640 介質過濾通過 1L 0.22 微米過濾器單位。標示過濾介質。無菌地將過濾介質加蓋且標示下列資訊。

【1000】 解凍一個 1.1 mL IL-2 等分試樣 (6×10^6 IU/mL) (BR71424) 直到所有冰融化。記錄 IL-2：批號及到期日。將 IL-2 儲備溶液轉移至介質。在 BSC 中，將 1.0 mL 的 IL-2 儲備溶液轉移至在步驟 8.1.8 中製備的 CM1 第 0 天介質瓶。添加 CM1 第 0 天介質 1 瓶及 IL-2 (6×10^6 IU/mL) 1.0 mL。將瓶加蓋並渦漩以混合含有 IL-2 之介質。重新標示為「完全 CM1

第0天介質」。

【1001】使用適當大小的吸量管移出20.0 mL的介質並分配至50ml錐形管。在BSC中，將25.0 mL的「完全CM1第0天介質」(在步驟8.1.13中製備)轉移至50 mL錐形管。將管標示為「組織片」。將G-Rex100MCS (W3013130)無菌地傳遞至BSC中。在BSC中，關閉所有G-Rex100MCS上的管夾，只剩通氣孔過濾器的管夾打開。將G-Rex100MCS培養瓶的紅色管線經由魯爾連接連接至中繼器泵流體轉移組(W3009497)的較大直徑端。將Baxa泵緊鄰BSC放置。將中繼器泵流體轉移組的泵管路部分從BSC移出並安裝至中繼器泵中。在BSC內，移除Pumpmatic Liquid-Dispensing System (PLDS)(W3012720)的注射器並丟棄。

【1002】將PLDS吸量管經由魯爾連接連接至中繼器泵流體轉移組的較小直徑端，並將吸量管尖放入「完全CM1第0天介質」中進行抽吸。打開介質與G-Rex100MCS之間的所有管夾。泵送完全CM1介質至G-Rex100MCS培養瓶中。設定泵速至「高」及「9」並將所有完全CM1第0天介質泵送至G-Rex100MCS培養瓶中。一旦所有介質皆轉移後，清除管線並停止泵。

【1003】將泵與培養瓶的連接斷開。確保培養瓶上的所有管夾皆關閉，但通氣孔過濾器除外。將中繼器泵流體轉移組自紅色介質管線移除，並將紅色蓋子(W3012845)蓋在紅色介質管線上。將G-Rex100MCS培養瓶自BSC移出，熱封紅色管線靠近末端魯爾的紅色蓋子。將G-

Rex100MCS培養瓶標示QA提供的過程中「第0天」標籤。將樣本附接以下的「第0天」標籤。孵養箱參數：37.0±2.0 °C；CO₂百分比：5.0±1.5 %CO₂。

【1004】將50mL錐形管放入孵養箱中≥30分鐘進行溫熱。

第0天腫瘤洗滌介質製備

【1005】添加建它黴素至HBSS。在BSC中，添加5.0 mL建它黴素(W3009832或W3012735)至1×500 mL HBSS介質(W3013128)瓶中。記錄體積。每瓶添加：HBSS (500.0 mL)；硫酸建它黴素50 mg/ml (5.0 mL)。徹底混合試劑。將步驟8.2.1製備的含建它黴素之HBSS過濾通過1L 0.22微米過濾器單位(W1218810)。無菌地將過濾介質加蓋且標示下列資訊。

第0天腫瘤處理

【1006】獲得腫瘤樣品並立即轉移至在2°C至8°C下的套件(suite)進行處理並記錄腫瘤資訊。標示三個50ml錐形管：第一個為「鑷子」、第二個為「解剖刀」、第三個為「新鮮腫瘤洗滌介質」。將5個100 mm培養皿標示為「洗滌1」、「洗滌2」、「洗滌3」、「繫留」及「不佳」。將一個6孔板標示為「較佳中間片段」。

【1007】使用適當大小吸量管，將5.0 mL的「腫瘤洗滌介質」轉移至一個較佳中間腫瘤片段6孔板的各孔中(總

共 30.0 mL)。使用適當大小吸量管，將在步驟 8.2.4 中製備的 50.0 mL「腫瘤洗滌介質」轉移至每個「洗滌 1」、「洗滌 2」、「洗滌 3」及「繫留」之 100 mm 培養皿中(總共 200.0 mL)。使用適當大小吸量管，將在步驟 8.2.4 中製備的 20.0 mL「腫瘤洗滌介質」轉移至每個 50 mL 錐形管中(總共 60.0 mL)。無菌地移除二個 6 孔板的蓋子。將蓋子利用於選定的腫瘤片。將腫瘤無菌地傳遞至 BSC 中。記錄處理開始時間。

【 1008 】 腫瘤洗滌 1：使用鑷子，將腫瘤自樣品瓶移出並轉移至「洗滌 1」。使用鑷子，輕柔洗滌腫瘤並記錄時間。將 20.0 mL(或可用體積)的溶液按照樣本計畫自腫瘤樣品瓶轉移至 50mL 錐形管。標示並在 2 至 8℃ 下儲存所收集的生物負載樣本直到提交測試為止。

【 1009 】 腫瘤洗滌 2：使用一支新的鑷子，將腫瘤自「洗滌 1」培養皿移出並轉移至「洗滌 2」培養皿。使用鑷子，藉由輕柔攪拌 ≥ 3 分鐘洗滌腫瘤樣品並允許其靜置。記錄時間。

【 1010 】 使用移液吸管，將 4 滴來自錐形管之腫瘤洗滌介質放入 6 孔板向上翻轉的蓋子(2 個蓋子)上的 6 個圓圈之各者中。二個圓圈多放一滴，總共 50 滴。

【 1011 】 腫瘤洗滌 3：使用鑷子，將腫瘤自「洗滌 2」培養皿移出並轉移至「洗滌 3」培養皿。使用鑷子，藉由輕柔攪拌洗滌腫瘤樣品並允許其靜置 ≥ 3 分鐘。記錄時間。

【1012】在150 mm培養皿蓋子下方放置一支尺。使用鑷子，將腫瘤樣品無菌地轉移至150 mm分割培養皿蓋子。將所有腫瘤樣品片端對端排列並記錄大約整體長度及片段數量。評估腫瘤的壞死/脂肪組織。評估是否觀察到> 30%的整體腫瘤區域為壞死及/或脂肪組織；如果是的話，確保腫瘤如果如此繼續進行的話具有適當大小。評估是否觀察到< 30%的整體腫瘤區域為壞死或脂肪組織；如果是的話，則繼續進行。

【1013】清除分割。如果腫瘤大且觀察到>30%的組織外部為壞死/脂肪，藉由移除壞死/脂肪組織來執行「清除分割」，同時使用解剖刀及/或鑷子的組合保留腫瘤內部結構。為了維持腫瘤內部結構，僅使用垂直切割壓力。不以解剖刀進行鋸切動作來切割。

【1014】使用解剖刀及/或鑷子之組合，將腫瘤樣品切割成均勻、適當大小的片段(至多6個中間片段)。為了維持腫瘤內部結構，僅使用垂直切割壓力。不以解剖刀進行鋸切動作來切割。確保保持非分割中間片段完全浸沒在「腫瘤洗滌介質」中。將各中間片段轉移至「繫留」培養皿。

【1015】一次操作一個中間片段，將腫瘤中間片段在分割培養皿中分割成大小大約3x3x3mm的片，將每片上的出血、壞死及/或脂肪組織的量最小化。為了維持腫瘤內部結構，僅使用垂直切割壓力。不以解剖刀進行鋸切動作來切割。

【1016】選擇至多八(8)個無出血、壞死及/或脂肪組織的腫瘤片。使用尺作為參考。持續分割直到已獲得8個較佳片，或已分割整個中間片段。將各選定片轉移至「腫瘤洗滌介質」液滴中之一者。

【1017】在從中間片段選擇至多八(8)片之後，將中間片段的殘留物放入「較佳中間片段」6孔板中的新單一孔。

【1018】如果仍有所欲組織，從「較佳中間片段」6孔板選擇額外較佳腫瘤片以最多50片填滿液滴。記錄所產生的分割片的總數。

【1019】將「組織片」50mL錐形管從孵養箱移出。確保錐形管加熱 ≥ 30 min。將「組織片」50mL錐形管傳遞至BSC中，確保不破壞開放處理表面的無菌性。

【1020】使用移液吸管、解剖刀、鑷子或組合，將選定的50個最佳腫瘤片段從較佳培養皿蓋子轉移至「組織片」50 mL錐形管。如果腫瘤片在轉移過程中掉落且仍有所欲組織，則添加來自較佳腫瘤中間片段孔的額外片。記錄片數。

【1021】將含有介質的G-Rex100MCS從孵養箱移出。將G-Rex100MCS培養瓶無菌地傳遞至BSC中。當轉移培養瓶時，不要握住容器的蓋子或底部。拿握側邊來轉移容器。在BSC中，將G-Rex100MCS培養瓶蓋子拿掉，確保維持內部管路的無菌性。渦漩含有腫瘤片的錐形管以懸浮，並將內容物快速倒入G-Rex100MCS培養瓶中。確保腫瘤片

均勻分布在培養瓶的膜上。如有需要將培養瓶輕柔來回傾斜，以使腫瘤片均勻分布。記錄容器底部膜上的腫瘤片段數量以及所觀察到漂浮在容器中的數量。注意：如果接種片段數量不等於收集的數量，聯絡地區管理，並記載在第10.0節。

【1022】 以下列參數孵養 G-Rex100MCS：孵養 G-Rex 培養瓶：溫度 LED 顯示： $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ；CO₂ 百分比： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。執行計算以判定在第11天將 G-Rex100MCS 移出孵養箱的適當時間。計算：孵養時間；下限=孵養時間+252小時；上限=孵養時間+276小時。

第11天，介質製備

【1023】 監測孵養箱。孵養箱參數：溫度 LED 顯示： $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ；CO₂ 百分比： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。將3個1000 mL RPMI 1640 介質 (W3013112) 瓶及3個1000 mL AIM-V (W3009501) 瓶在孵養箱中溫熱 ≥ 30 分鐘。記錄時間。介質：RPMI 1640及AIM-V。將額外1個1000 ml AIM-V介質瓶(W3009501)放在室溫下以供進一步使用。

【1024】 當時間到達後，移出RPMI 1640介質。記錄結束孵養時間於步驟8.4.4。確保介質溫熱 ≥ 30 min。在BSC中，從三個預熱的1000 mL RPMI 1640介質瓶中的每一瓶移出100.0 mL並放入標示「廢棄物」的適當大小容器。在BSC中，添加下列試劑到三個RPMI 1640介質瓶中的每一瓶，並記錄添加到每一瓶的體積。GemCell熱去活化AB

型人類血清(100.0 mL)、GlutaMax (10.0 mL)、硫酸建它黴素 50 mg/ml (1.0 mL)、2-巰乙醇(1.0 mL)。

【1025】將瓶加蓋並渦漩以確保試劑混合徹底。將每一瓶介質過濾通過分開的1L 0.22微米過濾器單位。將過濾介質無菌地加蓋並將每一瓶標示為CM1第11天介質。解凍3×1.1mL等分試樣的IL-2 (6×10^6 IU/mL)(BR71424)直到所有冰融化。記錄IL 2批號及到期日。

【1026】將三瓶AIM-V介質自孵養箱移出。記錄結束孵養時間。確保介質已溫熱 ≥ 30 分鐘。使用微量吸管，添加3.0mL解凍的IL-2至一瓶1L預熱AIM-V介質中。在分配IL-2後用介質潤洗微量吸管尖端。每個等分試樣使用新的無菌微量吸管尖端。記錄總添加體積。將瓶標示為「含有IL-2的AIM-V」。將10L Labtainer袋子及中繼器泵轉移組無菌地轉移至BSC中。關閉10L Labtainer袋子上的所有管線。將中繼器泵轉移組的較大直徑管路端經由魯爾鎖連接附接至10L Labtainer袋子的中間母埠。

【1027】將Baxa泵緊鄰BSC放置。將轉移組管路裝入Baxa泵。將Baxa泵設定至「高」及「9」。移除Pumpmatic Liquid-Dispensing System (PLDS)的注射器並丟棄。確保不破壞PLDS吸量管的無菌性。

【1028】將PLDS吸量管經由魯爾連接連接至中繼器泵流體轉移組的較小直徑端，並將吸量管尖放入含有IL-2的AIM-V介質瓶(在步驟8.4.13中製備)中進行抽吸。打開介質瓶與10L Labtainer之間的所有管夾。

【1029】使用PLDS，將製備的含有IL-2的預熱AIM-V介質以及二瓶額外的AIM-V轉移至10L Labtainer袋子中。添加三瓶過濾的CM1第11天介質。在添加最終瓶後，清除通往袋子的管線。注意：在添加每瓶介質之間停止泵。將PLDS自轉移組移除並將紅色蓋子蓋在BSC中之管線的魯爾上。輕柔按摩袋子以混合。將介質袋子標示下列資訊。到期日為自製備日期起的24小時。

【1030】將60mL注射器附接至「完全CM2第11天介質」袋子的可用母埠。移出20.0mL的介質並放入50mL錐形管中。將紅色蓋子蓋在「完全CM2第11天介質」袋子的母埠上。標示並在2至8°C下儲存介質保留樣本直到提交測試為止。熱封靠近紅色蓋子的轉移組管線上的紅色蓋子。將轉移組保持在袋子上。

【1031】在BSC中，添加4.5mL的已標示「用於細胞計數稀釋」及批號之AIM-V介質至四個15mL錐形管。將管標示批號及管編號(1至4)。將4支冷凍小瓶標示「餵養細胞」及小瓶編號(1至4)。將任何剩餘的2-巰乙醇、GlutaMax及人類血清自BSC轉移至2至8°C。

【1032】在BSC外，將1L轉移包接合至附接至經製備的「完全CM2第11天介質」袋子的轉移組。將轉移包標示為「餵養細胞CM2介質」及批號。在1L轉移包管路離袋子幾英寸處的管路上作一個記號。將空的轉移包放在磅秤上，使得該記號處以上的管路在磅秤上。將磅秤歸零，並將空的轉移包留在磅秤上。

【1033】將Baxa泵設定至「中」及「4」。將 500.0 ± 5.0 mL的在步驟8.4.22中製備的「完全CM2第11天」介質泵送至細胞CM2介質轉移包中。測量重量並記錄添加至轉移包的完全CM2介質體積。

【1034】一旦填滿，熱封管線。將含轉移組的CM2第11天介質袋與餵養細胞介質轉移包分開，將接合保留在1L轉移包。將所製備的「完全CM2第11天介質」放在孵養箱中直到使用。

第11天，TIL收集

【1035】孵養箱參數：溫度LED顯示： 37.0 ± 2.0 °C；CO₂百分比： 5.0 ± 1.5 %CO₂。將G-Rex100MCS自孵養箱移出前，執行檢查以確保符合孵養參數。下限與上述相同。

【1036】記錄自孵養箱移出的時間。小心地將G-Rex100MCS自孵養箱移出並確保所有管夾皆已關閉(大過濾器管線除外)。記錄處理開始時間。

【1037】將300mL轉移包標示為「TIL懸浮液」。將重力血液過濾器的TIL懸浮液轉移(單一管線)無菌接合。將300mL轉移包放在磅秤上並記錄乾重。將1L轉移包標示為「上清液」。

【1038】將來自G-Rex100MCS的紅色介質移除管線無菌接合至「上清液」轉移包。將來自G-Rex100MCS的透明細胞移除管線無菌接合至連接至「TIL懸浮液」轉移包之血液過濾器頂端的二個穿刺針管線的其中之一。將G-

Rex100MCS放在 GatheRex 的左側且將「上清液」及「TIL 懸浮液」轉移袋放在右側。

【1039】 將來自 G Rex100MCS 的紅色介質移除管線安裝至 GatheRex 上的頂部管夾(標示紅色管線)及管路導引器。將來自 G-Rex100MCS 的透明收集管線安裝至 GatheRex 上的底部管夾(標示藍色管線)及管路導引器。將來自 GatheRex 的氣體管線附接至 G-Rex100MCS 培養瓶的無菌過濾器。在從 G-Rex100MCS 培養瓶移除上清液之前，確保細胞移除管線上的所有管夾皆已關閉。將約 900 mL 的培養上清液從 G-Rex100MCS 轉移至 1L 轉移包。目視檢查 G-Rex100MCS 培養瓶以確保培養瓶水平且介質減少至抽吸液浸管的末端。

【1040】 在移除上清液後，將所有至紅色管線的管夾關閉。

【1041】 劇烈拍打培養瓶並渦漩介質以釋放細胞。檢視培養瓶以確保所有細胞皆已脫附。注意：如果細胞沒有脫附，聯絡地區管理。傾斜培養瓶遠離收集管路並允許腫瘤片沿著邊緣沉降。緩慢地將培養瓶傾向收集管路，使片維持在培養瓶的對側。如果細胞收集吸管不是位在側壁與底膜的交接處，當傾斜 45 度角時扣擊培養瓶通常足以正確地定位吸管。

【1042】 鬆開所有通往 TIL 懸浮液轉移包的管夾。使用 GatheRex，將細胞懸浮液轉移通過血液過濾器至 300mL 轉移包中。維持傾斜邊緣直到所有細胞及介質皆已收集。

檢視膜上有無附著細胞。潤洗 G-Rex100MCS 的底部。用潤洗介質覆蓋約 1/4 的氣體交換膜。確保所有管夾皆已關閉。在 TIL 懸浮液轉移包盡可能靠近接合處熱封(按照過程注意事項 5.12)，以使整體管路長度維持大約相同。將「上清液」轉移包熱封。維持足夠管線以接合。記錄 TIL 懸浮液轉移包的重量並計算細胞懸浮液的體積。

【1043】將 4”血漿轉移組接合至「上清液」轉移包，保留在 4”血漿轉移組上的魯爾連接，並轉移至 BSC 中。將 4”血漿轉移組接合至 300mL「TIL 懸浮液」轉移包，保留在 4”血漿轉移組上的魯爾連接，並轉移至 BSC 中。

【1044】自 1L「上清液」轉移包抽取大約 20.0 mL 的上清液並分配至標示「Bac-T」的無菌 50mL 錐形管中。使用適當大小的注射器自標示 BacT 的 50mL 錐形管移出 1.0 mL 樣本並接種厭氧瓶。

【1045】將 4 支冷凍小瓶標示小瓶編號(1至4)。使用分開的 3mL 注射器，自使用魯爾連接的 TIL 懸浮液轉移包抽出 4×1.0mL 細胞計數樣本並放入各別冷凍小瓶。將紅色蓋子(W3012845)蓋在管線上。將 TIL 轉移包放在孵養箱中直到需要為止。執行細胞計數及計算。執行未稀釋的初始細胞計數。如果不需要稀釋，「樣本[μL]」=200，「稀釋[μL]」=0。

【1046】記錄細胞計數及 TIL 數量。如果總存活 TIL 細胞為 $< 5 \times 10^6$ 個細胞，則繼續進行至「第 11 天 G-Rex 填充及接種」。如果總存活 TIL 細胞為 $> 5 \times 10^6$ ，則繼續進行至

「流動式細胞測量術的計算」。

流動式細胞測量術的計算。

【1047】 如果總存活 TIL 細胞計數為 $\geq 4.0 \times 10^7$ ，則計算體積以獲得流動式細胞測量術樣本的 1.0×10^7 個細胞。
 流動式細胞測量術所需的總存活細胞： 1.0×10^7 個細胞。
 流動式細胞測量術所需之細胞體積：存活細胞濃度除以 1.0×10^7 個細胞。

【1048】 如適用：重新計算總存活細胞及體積流。計算在移除以下細胞測量術樣本之後剩餘的總存活細胞及剩餘體積。

TIL 冷凍保存樣本

【1049】 如適用：計算用於冷凍保存的體積。計算要獲得用於冷凍保存的 1×10^7 個細胞所需之細胞體積。

表 534：冷凍保存計算

冷凍保存 所需之總 存活 TIL	存活細胞 濃度	冷凍保存 所需之 細胞體積 C=A+B
A. 1×10^7 細胞	B. 細胞 / mL	C. mL

【1050】 如適用：移出用於冷凍保存之樣本。自 TIL 懸浮液轉移包移出所計算之體積。放入適當大小的錐形管並標示為「冷凍保存樣本 1×10^7 細胞」、日期及批號。將紅色蓋子 (W3012845) 蓋在 TIL 懸浮液轉移包上。

【1051】根據下列參數將「冷凍保存樣本 1×10^7 個細胞」離心：速度：350 x g，時間：10:00分鐘，溫度：室溫，煞車：全速(9)；加速：全速(9)。

【1052】添加 CS-10。在 BSC 中，無菌地抽吸上清液。輕柔拍打管底部以將細胞重懸於剩餘流體中。添加 CS-10。緩慢添加 0.5mL 的 CS10。記錄添加的體積。冷凍保存填充約 0.5mL 的樣本小瓶。

第 11 天，餵養細胞

【1053】從 LN2 冷凍器獲得 3 袋至少二個不同批號的餵養細胞。將細胞保持在乾冰上直到準備解凍為止。記錄餵養細胞的細胞資訊。確認獲得至少二個不同批量的餵養細胞。將餵養細胞細胞袋放入基於批號之個別夾鏈袋中，並在 $37.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 水浴或 cytotherm 中解凍約 3 至 5 分鐘或直到冰開始消失。

【1054】餵養細胞細胞制具製備。將 4S-4M60 接合至 CC2 Cell Connect (W3012820)，用 4S-4M60 歧管的 4 穿刺針端置換 Cell Connect 設備的單一穿刺針。視需要接合。

【1055】附接介質轉移包將「餵養細胞 CM2 介質」轉移包接合至 CC2 魯爾。該袋將用無針注射埠附接至制具側邊。將含有完全 CM2 第 11 天介質的總成轉移至 BSC 中。

【1056】匯合解凍的餵養細胞。在 BSC 內，抽取 10mL 的空氣至 100mL 注射器中。使用此置換 CC2 上的 60mL 注射器。在移除罩蓋之前，用酒精棉擦拭餵養細胞袋上的每個

埠。使用CC2的三支穿刺針穿刺三個餵養細胞袋。在將穿刺針轉向一個方向時維持恆壓。確保不要穿刺埠側邊。打開活栓，使得來自餵養細胞袋的管線打開且通往無針注射埠的管線關閉。抽取餵養細胞袋的內容物至注射器中。所有三個袋子同時抽光。一旦餵養細胞袋已抽光，在維持注射器壓力下，將通往餵養細胞袋的管線夾住。不要拔開在制具注射器下方的注射器。記錄注射器中餵養細胞的總體積。

【1057】 添加餵養細胞至轉移包。轉動活栓，使得通往餵養細胞袋的管線關閉且通往介質轉移包的管線打開。確保通往介質轉移包的管線沒有夾住。自注射器分配餵養細胞至「餵養細胞CM2介質」轉移包。夾住通往含有餵養細胞的轉移包的管線並留下附接至制具的注射器。按摩袋子以混合轉移包中匯合的餵養細胞。將袋子標示為「餵養細胞懸浮液」。

【1058】 計算餵養細胞懸浮液的總體積。移出細胞計數樣本。每個樣本使用分開的3mL注射器，使用無針注射埠從餵養細胞懸浮液轉移包抽取4×1.0mL細胞計數樣本。將各樣本等分至標示的冷凍小瓶中。

【1059】 利用NC-200及過程注意事項5.14，執行細胞計數及計算。藉由添加0.5mL的細胞懸浮液至標示批號及「用於細胞計數稀釋」之4.5mL的AIM-V介質中，稀釋細胞計數樣本。此將給出1:10稀釋。

【1060】 記錄細胞計數及樣本體積。如果總存活細胞

< 5×10^9 個，則繼續進行。如果總存活細胞 $\geq 5 \times 10^9$ 個，則如上述較高細胞計數繼續進行。視需要獲得額外之餵養細胞且添加至如上所討論之轉移包。計算要獲得 5×10^9 存活餵養細胞所需之餵養細胞懸浮液的體積。計算要移除之過量餵養細胞的體積。向下捨入至最靠近的整數。

【 1061 】 移除過量餵養細胞。在新的 100mL 注射器中，抽取 10mL 的空氣並將注射器附接至制具。打開通往「餵養細胞懸浮液」轉移包的管線。使用注射器抽取所計算的餵養細胞體積加上來自轉移包之額外的 10.0mL 至 100mL 注射器。一旦移除餵養細胞體積，關閉通往餵養細胞懸浮液轉移包的管線。不要移除最終注射器。一旦注射器已填滿，用新的注射器置換。多支注射器可用於移除總體積。使用每支新的注射器時，抽取 10mL 的空氣。記錄移除餵養細胞的總體積(包括額外 10mL)。

【 1062 】 添加 OKT3。在 BSC 中，使用 1.0mL 注射器及 16G 針頭，抽取 0.15mL 的 OKT3。將注射器的針頭無菌地移除並將注射器附接至無針注射埠。注射 OKT3。打開通往「餵養細胞懸浮液」轉移包的活栓並添加先前移除的 10mL 餵養細胞以將 OKT3 沖過管線。將注射器由上翻轉向下並推注空氣以清除通往餵養細胞懸浮液轉移包的管線。將剩餘的餵養細胞懸浮液留在注射器中。關閉所有管夾並將制具從 BSC 移出。將餵養細胞懸浮液轉移包熱封，留下足夠管路以接合。

第11天，G-Rex填充及接種

【1063】設置G-Rex500MCS。將G-Rex500MCS自包裝移出並檢視培養瓶有無任何裂縫或管路扭結。確保所有魯爾緊密連接及封閉。關閉G-Rex500MCS管線上的所有管夾，但通氣孔過濾器管線除外。使用奇異筆在4.5L刻度處畫一條線。自孵養箱移出「完全CM2第11天介質」。

【1064】準備泵送介質。將G-Rex500MCS的紅色管線與附接至完全CM2第11天介質的中繼器泵轉移組接合。將「完全CM2第11天介質」袋子吊掛在IV點滴架上。將泵管路裝入Baxa泵。泵送介質至G-Rex500MCS中。將Baxa泵設定至「高」及「9」。泵送4.5L的介質至G-Rex500MCS中，填充至培養瓶4.5L刻度處標示的線。在靠近接合處熱封G-Rex500MCS的紅色管線。將培養瓶標示「第11天」標籤。將餵養細胞懸浮液轉移包接合至培養瓶。將G-Rex500MCS紅色管線無菌接合至「餵養細胞懸浮液」轉移包。

【1065】添加餵養細胞至G-Rex500MCS。打開餵養細胞懸浮液與G-Rex500MCS之間的所有管夾並藉由重力饋送添加餵養細胞懸浮液至培養瓶。在靠近接合處熱封紅色管線。將TIL懸浮液轉移包接合至培養瓶。將G-Rex500MCS紅色管線無菌接合至「TIL懸浮液」轉移包。

【1066】添加TIL至G-Rex500MCS。打開TIL懸浮液與G-Rex500MCS之間的所有管夾並藉由重力饋送添加TIL懸浮液至培養瓶。在靠近接合處熱封紅色管線，以移除TIL

懸浮液袋子。

【1067】 孵養 G-Rex500MCS。檢查 G-Rex500MCS 的所有管夾皆已關閉(大過濾器管線除外)，並放在孵養箱中。孵養箱參數：溫度 LED 顯示： $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ，CO₂ 百分比： $5.0 \pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。

【1068】 計算孵養窗。執行計算以判定在第16天將 G-Rex500MCS 移出孵養箱的適當時間。下限：孵養時間+108 小時。上限：孵養時間+132 小時。

第11天，過量 TIL 冷凍保存

【1069】 冷凍過量 TIL 小瓶。記錄並驗證放入控速冷凍器 (CRF) 中的小瓶總數。在完成冷凍後，將小瓶從 CRF 轉移至適當儲存容器。

第16天，介質製備

【1070】 預熱 AIM-V 介質。將三個 CTS AIM V 10L 介質袋在使用前至少 12 小時自 2 至 8°C 移出並放在室溫下避免光照。標示每一袋。記錄溫熱起始時間及日期。確保所有袋已溫熱一段介於 12 與 24 小時之間的期間。

【1071】 將流體泵轉移組的較大直徑端使用魯爾接頭附接至 10L Labtainer 袋子的一個母埠。設置 10L Labtainer 用於上清液。標示為「上清液」。設置 10L Labtainer 用於上清液。在從 BSC 移出之前，確保所有管夾關閉。

【1072】 每袋 CTS AIM V 介質解凍 5x1.1mL 等分試樣

的 IL-2(6×10^6 IU/mL)(BR71424)直到所有冰融化。將 100.0 mL 的 GlutaMax 等分至適當大小接受器中。記錄添加至各接受器的體積並將各接受器標示為「**GlutaMax**」。

【1073】添加 IL-2 至 GlutaMax。使用微量吸管，添加 5.0 mL 的 IL-2 至各 GlutaMax 接受器。確保按照過程注意事項 5.18 潤洗吸管尖，並且添加每 mL 使用新的吸量管尖。記錄添加至各 GlutaMax 接受器的體積並將各接受器標示為「**GlutaMax + IL-2**」及接受器編號。

【1074】製備用於調配之 CTS AIM V 介質袋。確保 CTS AIM V 10L 介質袋(W3012717)在使用前 12 至 24 小時在室溫下溫熱且避免光照。記錄結束孵養時間。在 BSC 中，關閉 4" 血漿轉移組上的管夾，接著使用穿刺針埠連接至該袋。在將穿刺針轉向一個方向時維持恆壓。確保不要穿刺埠側邊。將中繼器泵流體轉移組的較大直徑端經由魯爾連接至 4" 血漿轉移組。

【1075】將 Baxa 泵緊鄰 BSC 放置。將中繼器泵流體轉移組的泵管路部分從 BSC 移出並安裝至中繼器泵中。

【1076】準備調配介質。在 BSC 中，移除 Pumpmatic Liquid-Dispensing System (PLDS) 的注射器並丟棄。確保不破壞 PLDS 吸量管的無菌性。將 PLDS 吸量管經由魯爾連接連接至中繼器泵流體轉移組的較小直徑端，並將吸量管尖放入以上製備之「**GlutaMax + IL-2**」中進行抽吸。打開介於接受器與 10L 袋子之間的所有管夾。

【1077】泵送 **GlutaMax + IL-2** 至袋中。設定泵速至

「中」及「3」並將所有「GlutaMax + IL-2」泵送至10L CTS AIM V介質袋中。一旦沒有剩餘溶液，清除管線並停止泵。記錄添加至以下每個Aim V袋之含有IL-2之GlutaMax的體積。

【1078】移除PLDS。確保所有管夾關閉，並將PLDS吸量管從中繼器泵流體轉移組移除。移除中繼器泵流體轉移組並將4”血漿轉移組蓋上紅色蓋子。

【1079】標示所製備的每袋「完全CM4第16天介質」。

【1080】按照樣本計畫移除介質保留。使用30mL注射器，藉由將注射器附接至4”血漿轉移組移除20.0mL的「完全CM4第16天介質」，並分配樣本至50mL錐形管中。在移除注射器後，確保4”血漿轉移組用管夾夾住或用紅色蓋子蓋住。

【1081】附接新的中繼器泵流體轉移組。將新的流體泵轉移組的較大直徑端附接至連接至「完全CM4第16天介質」袋子的4”血漿轉移組上。用樣本計畫庫存標籤標示並在2至8°C下儲存介質保留樣本直到提交測試為止。

【1082】監測孵養箱。若適用，監測所製備的額外袋。孵養箱參數：溫度LED顯示： 37.0 ± 2.0 °C，CO2百分比： 5.0 ± 1.5 %CO2。

【1083】溫熱完全CM4第16天介質。在孵養箱中溫熱第一袋完全CM4第16天介質 \geq 30分鐘，直到準備使用為止。若適用，溫熱額外袋。

【1084】製備稀釋。在BSC中，添加4.5mL的已標示「用於細胞計數稀釋」之AIM-V介質至各4x15mL錐形管。標示錐形管。標示4個冷凍小瓶。

第16天REP分瓶

【1085】監測孵養箱。孵養箱參數：溫度LED顯示： $37.0\pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ，CO₂百分比： $5.0\pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。

【1086】自孵養箱移出G-Rex500MCS。執行以下檢查，以在自孵養箱移出G-Rex500MCS之前確保符合孵養參數：上限、下限、移出時間。自孵養箱移出G-Rex500MCS。

【1087】將1L轉移包(W3006645)熱封，留下約12”的管線。將1L轉移包標示為TIL懸浮液。將1L轉移包(包括完整管線)放在磅秤上並記錄乾重。

【1088】GatheRex設置。將G-Rex500MCS的紅色介質移除管線無菌接合至以上製備之10L labtainer袋「上清液」上的中繼器泵轉移組。將G-Rex500MCS的透明細胞移除管線無菌接合至以上製備的TIL懸浮液轉移包。將G-Rex500MCS培養瓶放在GatheRex的左側。將上清液labtainer袋及TIL懸浮液轉移包放在右側。將來自G-Rex500MCS的紅色介質移除管線安裝至GatheRex上的頂部管夾(標示紅色管線)及管路導引器。將來自G-Rex500MCS的透明收集管線安裝至GatheRex上的底部管夾(標示藍色管線)及管路導引器。將來自GatheRex的氣體管線附接至G-Rex500MCS的無菌過濾器。注意：在從G-Rex500MCS移除上清液之

前，確保細胞移除管線上的所有管夾皆已關閉。

【1089】 G-Rex500MCS 的體積減少。按照 SOP-01777，將約4.5L的培養上清液從 G-Rex500MCS轉移至 10L Labtainer。目視檢查 G-Rex500MCS以確保培養瓶水平且介質減少至抽吸液浸管的末端。

【1090】 製備培養瓶以進行 TIL 收集。在移除上清液後，將所有至紅色管線的管夾關閉。

【1091】 起始 TIL 收集。記錄 TIL 收集的起始時間。劇烈拍打培養瓶並渦漩介質以釋放細胞。檢視培養瓶以確保所有細胞皆已脫附。傾斜培養瓶以確保管子位在培養瓶邊緣。如果細胞收集吸管不是位在側壁與底膜的交接處，當傾斜45度角時扣擊培養瓶通常足以正確地定位吸管。

【1092】 TIL 收集。鬆開所有通往 TIL 懸浮液轉移包的管夾。使用 GatheRex，將細胞懸浮液轉移至 TIL 懸浮液轉移包中。注意：確定維持傾斜邊緣直到所有細胞及介質皆已收集。檢視膜上有無附著細胞。

【1093】 潤洗培養瓶膜。潤洗 G-Rex500MCS 的底部。用潤洗介質覆蓋約 1/4 的氣體交換膜。關閉 G-Rex500MCS 上的管夾。確保 G-Rex500MCS 上的所有管夾皆關閉。

【1094】 熱封。在含有 TIL 的轉移包盡可能靠近接合處熱封，以使整體管路長度維持大約相同。將含有上清液之 10L Labtainer 熱封並傳遞至 BSC 中進行樣本收集。

【1095】 記錄含細胞懸浮液之轉移包的重量並計算體積懸浮液。製備轉移包以進行樣本移除。將 4" 血漿轉移組

接合至上述 TIL 懸浮液轉移包，留下盡量靠近袋子附接的母魯爾端。

【1096】 移除細胞上清液的測試樣本。在 BSC 中，使用母魯爾埠及適當大小的注射器，自 10L labtainer 移出 10.0 mL 的上清液。放入 15mL 錐形管中並標示「BacT」且保留該管以用於 BacT 樣本。使用分開的注射器，移出 10.0 mL 的上清液並放入 15mL 錐形管中。保留該管用於黴漿菌測試樣本。標示管為「黴漿菌稀釋劑」。關閉上清液袋。將紅色蓋子蓋在魯爾埠上以關閉袋，並傳遞出 BSC。

【1097】 移出細胞計數樣本。在 BSC 中，每個樣本使用分開的 3mL 注射器，自「TIL 懸浮液」轉移包的魯爾連接移出 4x1.0 mL 細胞計數樣本。將樣本放入以上製備的冷凍小瓶中。

【1098】 移出黴漿菌樣本。使用 3mL 注射器，自 TIL 懸浮液轉移包移出 1.0 mL 並放入以上製備之標示「黴漿菌稀釋劑」的 15 mL 錐形管中。標示並在 2 至 8°C 下儲存黴漿菌樣本直到提交測試為止。

【1099】 製備用於接種之轉移包。在 BSC 中，將中繼器泵流體轉移組的大直徑管路端附接至含有 TIL 之轉移包上的魯爾轉接頭。使用止血鉗夾住靠近轉移包的管線。將紅色蓋子蓋在轉移組的端上。

【1100】 將 TIL 放入孵養箱中。將細胞懸浮液從 BSC 移出並放入孵養箱直到需要為止。記錄時間。

【1101】 執行細胞計數。利用 NC-200 執行細胞計數及

計算。最初藉由添加 0.5mL 的細胞懸浮液至以上製備的 4.5mL 的 AIM-V 介質中稀釋細胞計數樣本。此給出 1:10 稀釋。

【1102】計算培養瓶以進行繼代培養。計算要接種的培養瓶總數。注意：將 G-Rex500MCS 培養瓶的數量進位以求出最近的整數。

表 35：培養瓶計算

總存活細胞計數 A	每培養瓶所需 之目標細胞 B	接種之 G-Rex500MCS 培養瓶數量 C=A÷B
細胞	1.0×10^9 個細胞/培養瓶	培養瓶

【1103】接種之 G-Rex500MCS 培養瓶的最大數量為五。如果計算出的接種培養瓶數量超過五，使用可用細胞懸浮液的全部體積僅接種五瓶。

【1104】判定需要的額外介質袋數量。計算除了以上製備的袋子之外所需的介質袋數量。將所需的介質袋數量進位至下一個整數。

表 36：介質袋計算

接種之 G-Rex500MCS 培養瓶數量 A	所需的介 質袋數量 B=A÷2*	以上製備 的袋數量 C	應製備的額 外袋數量 D=B-C
		1	

【1105】視需要製備額外介質。以上計算之所需的每二個 G-REX -500M 培養瓶製備一個 10L 「CM4 第 16 天介質」袋。繼續進行並接種第一 GREX -500M 培養瓶，同時製備並溫熱額外介質。

【1106】視需要製備額外介質袋。製備並溫熱以上判定之計算數量的額外介質袋。

【1107】填充 G-Rex500MCS。在檯面上打開 G-Rex500MCS並檢視瓶身是否有裂縫或管路是否扭結。確保所有魯爾緊密連接及封閉。用奇異筆在培養瓶外面4500mL刻度處畫一條線。關閉 G-Rex500MCS上的所有管夾，但大過濾器管線除外。將 G-Rex500MCS的紅色介質管線無菌接合至以上製備之介質袋上的流體轉移組。

【1108】準備泵送介質。將「CM4第16天介質」吊掛在IV點滴架上。將泵管路裝入 Baxa 泵。

【1109】泵送介質至 G-Rex500MCS 中。將 Baxa 泵設定至「高」及「9」且泵送4500mL的介質至培養瓶中。泵送4.5L的「CM4第16天介質」至 G-Rex500MCS 中，填充至培養瓶如上標示的線。一旦已轉移4.5L的介質，停止泵。

【1110】熱封。在靠近所產生的接合處熱封 G-Rex500MCS的紅色介質管線，移除介質袋子。

【1111】重複填充。在溫熱及製備供使用的介質時，對以上所計算的每個培養瓶重複進行填充及封閉步驟。可使用重力填充或多個泵，同時填充多個培養瓶。每袋介質僅填充二個培養瓶。

【1112】記錄並標示填充的培養瓶。以字母及「第16天」標籤標示每個培養瓶。

【1113】視需要孵養培養瓶。在等待接種 TIL 時，將培養瓶保持在孵養箱中。記錄填充的培養瓶總數。

【1114】計算要添加的細胞懸浮液體積。計算要添加至新的 G-Rex500MCS 培養瓶之 TIL 懸浮液的目標體積。

表 637：細胞懸浮液體積

TIL 懸浮液總體積 A	填充的培養瓶數量	要轉移至每個培養瓶的細胞懸浮液目標體積 C = A ÷ B
mL		mL

【1115】如果培養瓶數量超過五個，使用細胞懸浮液的全部體積僅接種五瓶。

【1116】製備用於接種之培養瓶。自孵養箱移出步驟 8.10.70 的 G-Rex500MCS。

【1117】準備泵送。關閉 G-Rex500MCS 上的所有管夾，但大過濾器管線除外。將泵管路裝入 Baxa 泵。

【1118】自孵養箱移出 TIL。將「TIL 懸浮液」轉移包從孵養箱移出並記錄孵養結束時間。

【1119】製備用於接種之細胞懸浮液。將上述「TIL 懸浮液」轉移包無菌接合至泵入口管線。

【1120】將 TIL 懸浮液袋放在磅秤上。使用設定至「低」及「2」的 Baxa 泵，自 TIL 懸浮液袋灌注管線至接合處。將磅秤歸零。

【1121】用 TIL 懸浮液接種培養瓶。將 Baxa 泵設定至「中」及「5」。泵送以上計算之體積的 TIL 懸浮液至培養瓶中。記錄添加至每個培養瓶中之 TIL 懸浮液的體積。

【1122】熱封。將「TIL 懸浮液」轉移包熱封，留下足夠管路以接合至下一個培養瓶。

【1123】填充剩餘培養瓶。在每個接種的培養瓶之間，確保混合「TIL懸浮液」轉移包並重複填充及熱封步驟以接種所有剩餘培養瓶。

【1124】監測孵養箱。如果培養瓶必須分至兩個孵養箱，確保監測兩者。孵養箱參數：溫度LED顯示： 37.0 ± 2.0 °C，CO₂百分比： 5.0 ± 1.5 %CO₂。記錄每個培養瓶放入孵養箱中的時間。

【1125】計算孵養窗。執行以下計算以判定在第22天將G-Rex500MCS移出孵養箱的時間範圍。下限：時間+132小時；上限：時間+156小時。

第22天洗滌緩衝液製備

【1126】製備10 L Labtainer袋。在BSC中，經由魯爾連接將4"血漿轉移組附接至10L Labtainer袋。製備10 L Labtainer袋。標示「上清液」、批號及首字母/日期。轉移出BSC之前關閉所有管夾。注意：每二個所欲收集的G-Rex500MCS培養瓶製備一個10L Labtainer袋。

【1127】接合流體轉移組。在BSC外，關閉4S-4M60上的所有管夾。將中繼器流體轉移組接合至4S-4M60的一個公魯爾端。

【1128】將Plasmalyte-A及人類白蛋白25%傳遞至BSC中。將4S-4M60及中繼器流體轉移組總成傳遞至BSC中。

表 38：組分

組分說明	所需的量
Plasmalyte-A	3000.0 mL
人類白蛋白 25%	120.0 mL
4S-4M60 及中繼器 流體轉移組	1個設備 步驟 8.11.7

表 39 : Plasmalyte-A

乳膠：	非以天然橡膠乳膠製成
容器類型：	VIAFLEX
PVC:	含有PVC
DEHP:	含有 DEHP
體積：	500 ML
總卡路里：	21 Kcal/L
鈉：	140 mEq/L
鉀：	5 mEq/L
鎂：	3 mEq/L
乙酸鹽：	27 mEq/L
氯化物：	98 mEq/L
葡萄糖酸鹽：	23 mEq/L
滲透壓 (mOsmol/L):	294
比重：	1.01
pH:	7.4
填充範圍體積(mL)：	530 - 565
製造後儲存期限：	15個月
含有保存劑：	無
儲存建議：	儲存在室溫下(25°C/77°F)；短暫暴露至至多40°C/104°F不會不良地影響產品。
包裝：	單一包裝
僅Rx：	是

** 可購自

<http://ecatalog.baxter.com/ecatalog/loadproduct.html?cid=20016&lid=10001&hid=20001&pid=821874>。

【1129】將 Plasmalyte 泵送至 3000mL 袋子中。將三袋 Plasmalyte-A 用 4S-4M60 接頭組穿刺。注意：在移除埠罩蓋之前，用酒精拭子 (W3009488) 擦拭埠罩蓋。注意：在將穿刺針轉向一個方向時維持恆壓。確保不要穿刺埠側邊。將 Origen 3000mL 收集袋經由魯爾連接連接至中繼器泵轉移組的較大直徑端。關閉 3000mL Origen 袋之未使用管線上的管夾。將 Baxa 泵緊鄰 BSC 放置。將轉移組管路裝入位在 BSC 外之 Baxa 泵。將泵設定至「高」及「9」。打開自 Plasmalyte-A 至 3000mL Origen 袋的所有管夾。泵送所有 Plasmalyte-A 至 3000 mL Origen 袋中。一旦已轉移所有 Plasmalyte-A，停止泵。如有需要，藉由逆轉泵及操作袋子的位置，自 3000mL Origen 袋移除空氣。關閉所有管夾。

【1130】將 3000mL 袋子經由魯爾連接自中繼器泵流體轉移組移除並將紅色蓋子 (W3012845) 蓋在通往袋子的管線上。

【1131】添加人類白蛋白 25% 至 3000mL 袋子。打開通氣的迷你穿刺針。不破壞穿刺針的無菌性，確保藍色蓋子穩固蓋好。用通氣的迷你穿刺針穿刺人類白蛋白 25% 瓶子的隔膜。注意：確保不破壞穿刺針的無菌性。重覆二次，總共穿刺三 (3) 次人類白蛋白 25% 瓶子。移除一個通氣的迷你穿刺針的藍色蓋子並將 60mL 注射器附接至人類血清白蛋白 25% 瓶子。抽取 60mL 的人類血清白蛋白 25%。可能需要使用超過一瓶人類血清白蛋白 25%。如有需要，將注射

器與通氣的迷你穿刺針去連接並將注射器連接至在人類血清白蛋白25%瓶子中的下一個通氣的迷你穿刺針。一旦獲得60mL，將注射器自通氣的迷你穿刺針移除。將注射器附接至填充Plasmalyte-A之3000mL Origen袋子上的無針注射埠。分配所有人類白蛋白25%。重複以獲得最終體積120.0 mL的人類白蛋白25%。在添加所有人類白蛋白25%後，輕柔混合袋子。標示為「LOVO洗滌緩衝液」並指定24小時到期日。

【1132】製備IL-2稀釋劑。使用10mL注射器，使用LOVO洗滌緩衝液袋子上的無針注射埠移出5.0 mL的LOVO洗滌緩衝液。分配LOVO洗滌緩衝液至50mL錐形管中並標示為「IL-2稀釋劑」。

【1133】等分CRF空白袋LOVO洗滌緩衝液。使用100mL注射器，自無針注射埠抽取70.0 mL的LOVO洗滌緩衝液。注意：每次使用前用酒精棉擦拭無針注射埠。將紅色蓋子蓋在注射器上並標示為「空白冷凍袋」及批號。注意：將注射器保持在室溫下，直到步驟8.14.3需要為止。

【1134】完成洗滌緩衝液製備。關閉LOVO洗滌緩衝液袋上的所有管夾。

【1135】解凍IL-2。解凍一個1.1mL的IL-2 (6×10^6 IU/mL)直到所有冰融化為止。記錄IL-2批號及到期日。注意：確保IL-2標籤已附接。

【1136】IL-2製備。添加50 μ L IL-2原液(6×10^6 IU/mL)至標示「IL-2稀釋劑」之50mL錐形管。

【1137】IL-2製備。將錐形管重新標示「IL-2 6×10^4 」、日期、批號及24小時到期日。蓋上蓋子並儲存在 2°C 至 8°C 下。

【1138】冷凍保存製備。將5個冷凍卡匣放在 2°C 至 8°C 下前處理，以進行最終產物冷凍保存。

【1139】製備細胞計數稀釋。在BSC中，添加4.5mL的已標示批號及「用於細胞計數稀釋」之AIM-V介質至4支分開的15mL錐形管並將管標示。

【1140】製備細胞計數。將4支冷凍小瓶標示小瓶編號(1至4)。

第22天，TIL收集

【1141】監測孵養箱。孵養箱參數：溫度LED顯示： $37 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ，CO₂百分比： $5\% \pm 1.5\%$ 。

【1142】自孵養箱移出G-Rex500MCS培養瓶。檢查培養瓶並在自孵養箱移出G-Rex500MCS之前證實符合孵養參數(孵養時間)。

【1143】製備TIL收集袋。標示3000mL收集袋為「TIL懸浮液」、批號及首字母/日期。

【1144】密封多餘連接。將收集袋上的二個魯爾連接靠近每個連接末端處熱封。

【1145】GatheRex設置。將G-Rex500MCS的紅色介質移除管線(按照過程注意事項5.11)無菌接合至以上製備之10L labtainer袋。注意：參照過程注意事項5.16關於多個

GatheRex裝置的使用。將G-Rex500MCS的透明細胞移除管線(按照過程注意事項5.11)無菌接合至以上製備之TIL懸浮液收集袋。將G-Rex500MCS培養瓶放在GatheRex的左側。將上清液Labtainer袋及匯合的TIL懸浮液收集袋放在右側。將來自G-Rex500MCS的紅色介質移除管線安裝至GatheRex上的頂部管夾(標示紅色管線)及管路導引器。將來自G-Rex500MCS的透明收集管線安裝至GatheRex上的底部管夾(標示藍色管線)及管路導引器。將來自GatheRex的氣體管線附接至G-Rex500MCS的無菌過濾器。在從G-Rex500MCS移除上清液之前，確保細胞移除管線上的所有管夾皆已關閉。

【1146】 體積減少。將約4.5L的上清液從G-Rex500MCS轉移至上清液袋。目視檢查G-Rex500MCS以確保培養瓶水平且介質減少至抽吸液浸管的末端。若有需要重複步驟。

【1147】 製備培養瓶以進行TIL收集。在移除上清液後，將所有至紅色管線的管夾關閉。

【1148】 起始TIL的收集。記錄TIL收集的起始時間。劇烈拍打培養瓶並渦漩介質以釋放細胞。檢視培養瓶以確保所有細胞皆已脫附。將「TIL懸浮液」3000mL收集袋放在平坦表面上的乾擦巾上。傾斜培養瓶以確保管子位在培養瓶邊緣。注意：如果細胞收集管子不是位在側壁與底膜的交接處，當傾斜45度角時扣擊培養瓶通常足以正確地定位管子。

【1149】 TIL收集。鬆開所有通往TIL懸浮液收集袋的

管夾。使用 GatheRex，將 TIL 懸浮液轉移至 3000mL 收集袋中。注意：維持傾斜邊緣直到所有細胞及介質皆已收集。檢視膜上有無附著細胞。

【1150】潤洗培養瓶膜。潤洗 G-Rex500MCS 的底部。用潤洗介質覆蓋約 1/4 的氣體交換膜。

【1151】關閉 G-Rex500MCS 上的管夾。確保所有管夾皆已關閉。

【1152】熱封。在含有 TIL 的收集袋盡可能靠近接合處熱封，以使整體管路長度維持大約相同。將上清液袋子熱封。

【1153】完成收集剩餘的 G-Rex 500 MCS 培養瓶。重複以上步驟，將所有 TIL 匯合至相同的收集袋。每個第二培養瓶後必須置換 10L 上清液袋。

【1154】製備 LOVO 來源袋。獲得新的 3000mL 收集袋。標示為「LOVO 來源袋」、批號及首字母/日期。將「LOVO 來源袋」上的管路熱封，移除母魯爾，留下足夠管線以接合。

【1155】秤重 LOVO 來源袋。將適當大小的塑膠籃放在磅秤上並歸零。將 LOVO 來源袋(包括埠及管線)放在籃中並記錄乾重。

【1156】將細胞懸浮液轉移至 LOVO 來源袋中。關閉 170 μm 重力血液過濾器的所有管夾。

【1157】將細胞懸浮液轉移至 LOVO 來源袋中。將重力血液過濾器的長形末端無菌接合至 LOVO 來源袋。將過

濾器的二個來源管線其中一個無菌接合至「匯合TIL懸浮液」收集袋。一旦接合完成，將過濾器上未使用的管線熱封以移除。打開所有必要管夾並藉由將收集袋吊掛在IV點滴架上抬高TIL懸浮液，以起始TIL重力-流動轉移通過血液過濾器並進入LOVO來源袋。排放時輕柔轉動或揉捏TIL懸浮液袋以保持TIL為均勻懸浮液。

【1158】 關閉所有管夾。一旦所有TIL皆轉移至LOVO來源袋，關閉所有管夾。

【1159】 熱封。在盡可能靠近接合處熱封(按照過程注意事項5.12)，以移除重利血液過濾器。

【1160】 移出細胞計數樣本。在BSC中，每個樣本使用分開的3mL注射器，自LOVO來源袋的無針注射埠移出4×1.0mL細胞計數樣本。將樣本放入在步驟8.11.36中製備的冷凍小瓶。

【1161】 執行細胞計數。利用NC-200執行細胞計數及計算。最初藉由添加0.5mL的細胞懸浮液至以上製備的4.5mL的AIM-V介質中稀釋細胞計數樣本。此給出1：10稀釋。

【1162】 記錄細胞計數及樣本體積。計算總存活TIL細胞。如果總存活細胞 $\geq 1.5 \times 10^9$ ，繼續進行。計算總成核細胞。

【1163】 製備黴漿菌稀釋劑。在BSC中，自一個上清液袋經由魯爾樣本埠移出10.0 mL並放入15mL錐形管。標示15mL錐形管為「黴漿菌稀釋劑」。

LOVO

【1164】打開LOVO並開始「TIL G-Rex收集」規程並遵守螢幕提示。緩衝劑類型為PlasmaLyte。遵守LOVO觸控螢幕提示。

【1165】判定最終產物目標體積。使用總成核細胞(TNC)值及以下表，判定最終產物目標體積並記錄(mL)。

表 40：計算最終產物體積

細胞範圍	最終產物(滯留物)目標體積(mL)
$0 < \text{總(存活+死亡)細胞} \leq 7.1 \times 10^{10}$	165
$7.1 \times 10^{10} < \text{總(存活+死亡)細胞} \leq 1.1 \times 10^{11}$	215
$1.1 \times 10^{11} < \text{總(存活+死亡)細胞} \leq 1.5 \times 10^{11}$	265

【1166】遵守LOVO觸控螢幕提示。

【1167】裝載拋棄式套組。在裝載拋棄式套組之前，用酒精棉隨後用無棉絨擦巾擦拭壓力感測器埠。裝載拋棄式套組。遵守螢幕指示裝載拋棄式套組。

【1168】移除濾液袋。當已裝載標準LOVO拋棄式套組，輕觸Next鍵。顯示容器資訊及位置螢幕(Container Information and Location Screen)。自磅秤移除濾液袋。

【1169】確保濾液容器是新的且離開磅秤(New and Off-Scale)。

【1170】輸入濾液容量。將LOVO Ancillary Bag無菌接合至現有濾液袋的公魯爾管線上。確保所有管夾打開且流體路徑為透明。輕觸濾液容器容量(Filtrate Container

Capacity)輸入欄位。顯示數字鍵盤。輸入新的總濾液容量(5,000mL)。輕觸按鍵以接受輸入。注意：預估濾液體積不應超過5000 mL。

【1171】將濾液容器放在檯面上。注意：如果接合期間將管路移出F管夾，將管路放回管夾。將新的濾液容器放在檯面上。不要將濾液袋吊掛在3號磅秤上。3號磅秤在程序期間將是空的。

【1172】在變換至濾液容器後，遵守LOVO觸控螢幕提示。

【1173】確保套組裝載正確。顯示拋棄式套組乾式檢查(Disposable Kit Dry Checks)覆蓋。檢查套組裝載正確，且所有管夾皆打開。檢查所有管路有無扭結或其他阻塞且可能的話進行改正。確保套組正確安裝且檢查所有Robert氏管夾。按壓Yes鍵。所有LOVO機械式管夾自動關閉且顯示檢查拋棄式套組安裝(Checking Disposable Kit Installation)螢幕。LOVO進行一系列加壓步驟以檢查套組。

【1174】套組檢查結果。如果通過套組檢查，繼續進行至下一步驟。*如果未通過，在檢查完畢後可進行第二次套組檢查。*如果未通過，檢查所有管路有無扭結或其他阻塞且進行改正。*如果未通過，確保套組正確安裝且檢查所有Robert氏管夾。如果第二次套組檢查失敗：聯絡地區管理並準備安裝第10.0節的新套組。重複需要的步驟8.13.23至步驟8.13.30。

【1175】附接PlasmaLyte。顯示連接溶液(Connect

Solutions)螢幕。洗滌值將總是為3000 mL。在螢幕上輸入此值。

【 1176】 將PlasmaLyte的3000mL袋子無菌接合至通過管夾1的管路。將PlasmaLyte袋吊掛在IV點滴架上，兩個角落袋環皆掛在鈎上。

【 1177】 驗證PlasmaLyte已附接。打開任何塑膠管夾。驗證溶液體積輸入為3000mL。輕觸「Next」鍵。顯示拋棄式套組灌注(Disposable Kit Prime)覆蓋。驗證PlasmaLyte已附接且通往PlasmaLyte袋的管路上之任何接合及塑膠管夾皆打開，接著輕觸Yes鍵。

【 1178】 觀察PlasmaLyte正在移動。拋棄式套組灌注開始且顯示灌注拋棄式套組螢幕(Priming Disposable Kit Screen)。目視觀察PlasmaLyte正在移動通過連接至PlasmaLyte袋子的管路。如果流體沒有移動，按壓螢幕上的暫停鍵並判定管夾或接合是否仍然關閉。一旦問題已解決，按壓螢幕上的恢復鍵以恢復拋棄式套組灌注(Disposable Kit Prime)。遵守LOVO觸控螢幕提示。

【 1179】 附接來源容器至管路。將在步驟8.12.31中製備之LOVO來源袋按照過程注意事項5.11無菌接合至通過管夾S的管路。可能必須將管路自管夾移除。注意：如果移除，確定將來源管路置換成S管夾。

【 1180】 吊掛來源容器。將來源容器吊掛在IV點滴架上，兩個角落袋環皆掛在鈎上。不要將來源吊掛在1號磅秤上。打開所有通往來源袋的管夾。

【1181】 驗證來源容器已附接。輕觸Next鍵。顯示來源灌注(Source Prime)覆蓋。驗證來源附接至拋棄式套組，且通往來源的管路上之任何接合及塑膠管夾皆打開。輕觸Yes鍵。

【1182】 證實PlasmaLyte正在移動。來源灌注開始且顯示灌注來源螢幕(Priming Source Screen)。目視觀察PlasmaLyte正在移動通過附接至來源袋的管路。如果流體沒有移動，按壓螢幕上的暫停鍵並判定管夾或接合是否仍然關閉。一旦問題已解決，按壓螢幕上的恢復鍵以恢復來源灌注(Source Prime)。

【1183】 開始程序螢幕(Procedure Screen)。當來源灌注成功完成時，顯示開始程序螢幕(Start Procedure Screen)。按壓開始，在按壓開始後立即出現「預洗滌循環1(Pre-Wash Cycle 1)」暫停螢幕。

【1184】 倒轉過程中袋子(In Process Bag)。將過程中袋子自2號磅秤移除(亦可自過程中頂埠管路導引器移除管路)且將其手動倒轉以允許在拋棄式套組灌注步驟期間添加的洗滌緩衝液塗佈袋子的所有內部表面。重新將過程中袋子吊掛在2號磅秤上(袋子上的標籤朝向左側)。置換管路導引器中的頂埠管路如果其被移除。

【1185】 倒轉來源袋。在按下開始鍵之前，在不將來源袋自IV點滴架移除的情況下，藉由按摩袋子角落並輕柔攪拌細胞混合來源袋，以產生均質細胞懸浮液。按壓恢復鍵。LOVO開始處理來自來源袋的流體且顯示洗滌循環1螢

幕(Wash Cycle 1 Screen)。

【1186】來源潤洗暫停。一旦來源容器排空且 LOVO 已添加洗滌緩衝液至來源袋，顯示潤洗來源暫停(Rinse Source Pause)螢幕。在不將來源袋自IV點滴架移除的情況下，按摩角落並混合均勻。按壓恢復。

【1187】混合過程中袋子暫停。要製備用於另一通過旋轉機之通道的細胞，將過程中袋子用洗滌緩衝液稀釋。在添加洗滌緩衝液至過程中袋子後，LOVO將自動暫停且顯示「混合過程中袋子(Mix In Process Bag)」暫停螢幕。在不將袋子自磅秤移除的情況下，輕柔擠壓袋子將產物混合均勻。按壓恢復。

【1188】按摩過程中角落暫停。當過程中袋子清空時，將洗滌緩衝液添加至過程中袋子的底埠以潤洗袋子。在添加潤洗液後，LOVO自動暫停且顯示「按摩IP角落(Message IP corners)」暫停螢幕。當「按摩IP角落」暫停螢幕顯示時，不要移除2號磅秤上的袋子。當過程中袋子仍然吊掛在2號磅秤上時，按摩袋子角落以將任何殘餘細胞帶入懸浮液中。確保袋子沒有在磅秤上晃動並按壓恢復鍵。

【1189】等待移除產物螢幕。在LOVO程序結束時，顯示移除產物螢幕(Remove Products Screen)。當此螢幕顯示時，可操作LOVO套組上的所有袋子。注意：不觸碰任何袋子，直到顯示移除產物(Remove Products)為止。

【1190】移除滯留物袋。將止血鉗夾住非常靠近滯留

物袋上之埠的管路，以防止細胞懸浮液沉降進入管路中。在止血鉗下方熱封(按照過程注意事項5.12)，確定維持足夠管線以在步驟8.13.48中接合。移除滯留物袋。

【1191】製備用於調配之滯留物袋。將4”血漿轉移組之母魯爾鎖端接合至滯留物袋。轉移滯留物袋。

【1192】移除產物。遵守移除產物螢幕(Remove Products Screen)上之指示。關閉LOVO套組上之所有管夾以預防流體移動。

【1193】移除產物。輕觸Next鍵。所有LOVO機械式管夾打開且顯示移除套組螢幕(Remove Kit Screen)。

【1194】記錄資料。遵守移除套組螢幕上之指示。輕觸「Next」鍵。所有LOVO機械式管夾關閉且顯示結果摘要螢幕(Results Summary Screen)。記錄結果摘要螢幕上的資料。關閉所有泵及過濾器支持。當LOVO提示時將套組移除。所記錄的所有時間直接由LOVO記錄。

最終調配及填充

【1195】目標體積/袋計算。從以下表DDD，選擇對應以上LOVO滯留物體積的欲填充之CS750袋子數量、每袋之目標填充體積、每袋之移除保留體積及每袋之最終目標體積。

表 41：目標體積/袋計算

LOVO 產物體積	添加至 產物之 CS10 體積	調配產物 之最終預 期體積	欲填充 之袋子 數量	每袋之 目標填 充體積	每袋之 移除保 留體積	每袋之 最終目 標體積
165mL	165mL	330mL	3	107mL	7mL	100mL
215mL	215mL	430mL	4	105mL	5mL	100mL
265mL	265mL	530mL	4	130mL	5mL	125mL

【1196】製備 CRF 空白。計算 CS-10 及 LOVO 洗滌緩衝液之體積以調配空白袋。

表 42：經計算的體積。

每袋之最終 目標體積 A	空白 LOVO 洗滌緩衝液 體積 B = A / 2	空白 CS-10 體積 (mL) C = B
mL	mL	mL

【1197】製備 CRF 空白。在 BSC 外，使用以上製備之 LOVO 洗滌緩衝液的注射器，經由魯爾連接添加經計算之體積至任何空的 CS750 袋。注意：空白 CS750 袋調配不需要無菌進行。使用適當大小之注射器，添加經計算之 CS-10 體積至以上製備之相同的 CS750 袋。將紅色蓋子蓋在 CS750 袋上。盡可能移除 CS-750 袋中盡量多的空氣。在盡可能靠近袋子處熱封 CS750 袋，移除管路。將 CS750 袋標示「CRF 空白」、批號及首字母/日期。將 CRF 空白放在冰袋上，直到將其放入 CRF 中為止。

【1198】計算 IL-2 所需體積。計算欲添加至最終產物之 IL-2 的體積。

表 43：經計算的IL-2體積

參數	公式	結果
最終滯留物體積	步驟 8.13.51	A. mL
最終調配體積	$B = A \times 2$	B. mL
所欲最終IL-2濃度(IU/mL)	300 IU/mL	C. 300 IU/mL
所需之IL-2的IU	$D = B \times C$	D. IU
來自步驟8.11.33之IL-2工作原液	6×10^4 IU/mL	E. 6×10^4 IU/mL
添加至最終產物之IL-2體積	$F = D \div E$	F. mL

【1199】組裝連接設備。將4S-4M60無菌接合至CC2 Cell Connect，用4S-4M60歧管的4穿刺針端置換Cell Connect設備的單一穿刺針。

【1200】組裝連接設備。將CS750冷凍袋無菌接合至以上製備之制具，將四個公魯爾端(E)中之一者置換成各袋。將CS-10袋接合(按照過程注意事項5.11)至4S-4M60的穿刺針。將袋子放在二個在2至8°C下處理的冰袋之間以保持CS-10低溫。

【1201】製備含IL-2之TIL。使用適當大小的注射器，自「IL-2 6×10^4 」等分試樣移除以上判定之量的IL-2。將注射器經由魯爾連接連接至以上製備之滯留物袋並注射IL-2。自注射器推注空氣通過管線以清除管線。

【1202】標示經調配的TIL袋。關閉轉移組上的管夾並將袋子標示為「經調配的TIL」並將袋傳遞出BSC。

【1203】將經調配的TIL袋添加至設備。一旦IL-2已添加，將「經調配的TIL」袋接合至設備上剩餘的穿刺針。

【1204】添加CS10。將經組裝的、附接有經調配的TIL、CS-750袋及CS-10之設備傳遞至BSC中。注意：將CS-10袋及所有CS-750袋放在二個在2°C至8°C下預處理的冰袋之間。不要將經調配的TIL袋放在冰袋上。確保設備上的所有管夾皆關閉。轉動活栓使注射器關閉。

【1205】更換注射器。抽取約10mL的空氣進入100mL注射器並置換設備上的60mL注射器。

【1206】添加CS10。轉動活栓使通往CS750袋的管線關閉。打開通往CS-10袋的管夾並抽取以上計算之體積至注射器中。注意：將使用多個注射器以添加適當體積之CS-10。關閉通往CS-10之管夾且打開通往經調配的TIL袋之管夾且添加CS-10。以大約10.0mL/分鐘，添加第一個10.0mL之CS10。以大約1.0mL /sec之速率，添加剩餘的CS-10。注意：使用多個注射器以添加適當體積之CS-10。記錄時間。注意：自第一次添加CS-10至開始冷凍的目標時間為30分鐘。記錄每次CS10添加之體積及總添加體積。關閉所有通往CS10袋的管夾。

【1207】製備CS-750袋。轉動活栓使注射器打開。打開通往經調配的TIL袋之管夾且抽取懸浮液到懸浮液即將到達活栓之前停止。關閉通往經調配的TIL袋之管夾。轉動活栓使其打開通往空的CS750最終產物袋。使用新的注射器，藉由將空氣抽出，盡可能移除CS750最終產物袋中盡量多的空氣。在維持注射器柱塞的壓力下，夾住關閉袋子。抽取約20mL空氣進入新的100mL注射器並連接至設

備。注意：每個CS-750最終產物袋應在二個冰袋之間以保持經調配的TIL懸浮液低溫。

【1208】 分配細胞。轉動活栓使通往最終產物袋的管線關閉。自經調配的TIL袋抽取以上計算的體積至注射器中。注意：多支注射器可用於獲得正確體積。轉動活栓使通往經調配的TIL袋的管線關閉。一次處理一個最終產物袋，將細胞分配至最終產物袋。記錄添加至以上每個CS750袋之細胞的體積。用注射器中的空氣清除管線，以使細胞等齊於穿刺針埠的頂部。關閉經填充的袋子上的管夾。每個最終產物袋皆重複步驟，在每袋之間輕柔混合經調配的TIL袋。記錄放入以下每個最終產物袋中之TIL的體積。

【1209】 移除最終產物袋中的空氣並取出保留。一旦最後的最終產物袋已填充，關閉所有管夾。抽取約10mL的空氣進入新的100mL注射器並置換設備上的注射器。一次操作單一袋子，抽取每個產物袋的所有空氣加上以上判定用於保留之產物體積。注意：當移除樣本體積時，倒轉注射器並使用空氣清除管線至產物袋的頂埠。一旦保留體積及空氣已移除，夾住通往袋子的管線。

【1210】 記錄自每袋移除之保留體積。

【1211】 分配保留。將保留分配至50mL錐形管並標示管為「保留」及批號。重複進行於每袋。

【1212】 製備最終產物以進行冷凍保存。使用止血鉗，靠近袋子夾住管線。移除注射器並將原本安裝注射器

的設備上的魯爾連接蓋上紅色蓋子。將設備傳遞出BSC。在F(按照過程注意事項5.12)熱封，移除空的滯留物袋及CS-10袋。注意：保留設備上用於注射器之魯爾連接。丟棄空的滯留物及CS-10袋。

【1213】標示最終產物袋。將樣本附接以下的最終產物標籤。

【1214】製備最終產物以進行冷凍保存。將冷凍袋保持在冰袋上或2至8°C下，直到冷凍保存為止。

【1215】移出細胞計數樣本。使用適當大小的吸量管，移除2.0 mL以上移除的保留並放入欲用於細胞計數之15mL錐形管。

【1216】執行細胞計數。利用NC-200執行細胞計數及計算。注意：僅稀釋一個樣本至適當稀釋以驗證稀釋即已足夠。稀釋額外樣本至適當稀釋因數並繼續進行計數。記錄細胞計數及樣本體積。注意：如果不需要稀釋，「樣本[μL]」=200，「稀釋[μL]」=0。判定平均存活細胞濃度且執行細胞計數之存活性。

【1217】計算流動式細胞測量術樣本。執行計算以確保用於流動式細胞測量術取樣之足夠細胞濃度。

表 44：計算流動式細胞測量術細胞濃度

存活細胞濃度 A	6×10^7 個TVC 所需之目標體積 B = 6×10^7 細胞 / A	B是否 ≤ 1.0 mL? (是/否 ^{**})
	mL	

【1218】經計算之IFN-γ樣本。執行計算以確保用於

IFN- γ 取樣之足夠細胞濃度。

【1219】 熱封。一旦樣本體積已判定，在盡可能靠近袋子處熱封最終產品袋，以自設備移除。

表 745：標示及收集樣本

樣本	容器數量	添加至各者之樣本體積	容器類型
* 黴漿菌	1	1.0 mL	15 mL 錐形管
內毒素	2	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
革蘭氏染色	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
IFN-g	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
流動式細胞測量術	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
**Bac-T 無菌性	2	1.0 mL	Bac-T 瓶子
QC 保留	4	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
衛星小瓶	10	0.5 mL	2 mL 冷凍小瓶

【1220】 以黴漿菌樣本而言，將經調配的細胞懸浮液體積添加至上述標示「黴漿菌稀釋劑」之 15mL 錐形管。無菌性 & BacT。測試取樣。在 BSC 中，使用適當大小的注射器，自上述收集之保留的細胞懸浮液移出 1.0mL 樣本並接種厭氧瓶。重複上述於好氧瓶。

【1221】 標示且儲存樣本。用樣本計畫庫存標籤標示所有樣本並適當儲存直到轉移為止。繼續下面步驟進行最終產物及樣本的冷凍保存。

最終產物冷凍保存

【1222】 準備控速冷凍器。驗證 CRF 已在冷凍之前設

置。記錄CRF設備。執行冷凍保存。

【1223】設置CRF探針。穿刺CRF空白袋上的隔膜。插入6mL小瓶溫度探針。

【1224】將最終產物及樣本放入CRF中。將空白袋放入預處理的卡匣中且轉移至CRF架的大約中間位置。將最終產物卡匣轉移至CRF架中且將小瓶轉移至CRF小瓶架中。將產物架及小瓶架轉移入CRF中。記錄將產物轉移入CRF的時間及室溫度。

【1225】判定達到 $4^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 的所需時間且進行CRF運行。一旦室溫度達到 $4^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ ，開始運行。記錄時間。

【1226】完成及儲存。運行完成後停止CRF。將卡匣及小瓶自CRF移除。將卡匣及小瓶轉移至氣相LN2儲存。

實例 17：產生富含腫瘤抗原特異性T細胞且具有增強治療活性的TIL產物

【1227】目標：為了產生富含腫瘤抗原特異性T細胞且具有增強治療活性的TIL產物。

背景：

【1228】與惡性病灶相關之T細胞一般而言功能異常且無法控制/預防腫瘤生長(Schietinger et al. Immunity 2016)。所有此實例中之文獻以參照方式整體納入以符合所有目的。

【1229】腫瘤浸潤淋巴球(TIL)可經萃取、活化及離體

增殖且在體內重新輸注時誘導有效的抗腫瘤反應(Rosenberg et al. Clin Cancer Res 2011)。最先在罹患轉移性黑色素瘤的患者使用的過繼性細胞轉移方式在額外的實質腫瘤組織學中測試。TIL療法在黑色素瘤及頭頸癌及子宮頸癌的臨床活性已經報告(SITC, 2017)。因此，可將腫瘤特異性TIL自抑制性腫瘤微環境救援且重新調理及/或擴增至足夠數量以有效地靶向腫瘤。

【1230】TIL臨床試驗的回溯分析暗示具有強健增生及存活能力的較低分化腫瘤反應性T細胞相對於效應及效應記憶T細胞授予優異的抗腫瘤療效且後代TIL產物應一致地包含較高水準的較低分化T細胞(Klebanoff et al. J Immunother 2012)。

【1231】幹記憶T細胞(TSCM)是抗原經歷中央記憶T細胞的早期祖細胞；它們顯示定義幹細胞的長期存活、自我再生及多能能力；且因此被視為用於產生有效TIL產物之最為所欲。TSCM在過繼性細胞轉移的小鼠模型中已顯示相較於其他T細胞子集增強的抗腫瘤活性(Gattinoni et al. Nat Med 2009, 2011; Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012; Cieri et al. Blood 2013)。

【1232】需要使TIL組成物偏向高比例的TSCM之策略，以確保最佳抗腫瘤活性。

【1233】抗原經歷T細胞的回春係使用經由誘導多能幹細胞(iPSC)技術開發的重新編程工具達成(Nishimura et al. Cell Stem Cell 2012; Vizcardo et al. Cell Stem Cell

2012)。此方式需要將 iPSC 進一步離體分化成最適合打擊腫瘤的 T 細胞族群，使其成為容易限制原始 T 細胞受體 (TCR) 貯庫的耗時 2 步驟過程。關於細胞內材料遞送的體外及體內遞送策略，亦見 Stewart, et al. 538:183-192 (2016)。

【1234】傳訊途徑包括 Wnt、NOTCH 及 Myb 已顯示支持從初始及 / 或抗原經歷 T 細胞直接產生 TSCM 樣細胞 (Gattinoni et al. Nat Med 2009, Kondo et al. Nat Comm 2017, Gautam et al. SITC 2017)。

【1235】細胞命運重新編程需要暫時性暴露至適當轉錄因子 (TF)。以 TIL 為例，此暴露需要靶向一大組份的 T 細胞以保留腫瘤衍生之 TCR 貯庫。

【1236】無 SQZ 載體微流體平台代表一種先進的細胞內遞送策略；其已證實遞送蛋白質包括轉錄因子至多種初代人細胞包括 T 細胞的能力 (Sharei et al. PNAS 2013 以及 Sharei et al. PLOS ONE 2015 及 Greisbeck et al. The J of Immunology vol. 195, 2015)。亦見國際專利公開案 WO 2013/059343A1、WO 2017/008063A1 及 WO 2017/123663A1，所有全文皆以引用方式併入本文中。該等描述於國際專利公開案 WO 2013/059343A1、WO 2017/008063A1 及 WO 2017/123663A1 之方法可為本發明所採用，以暴露 TIL 族群至轉錄因子 (TF) 及 / 或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現的分子，其中 TF 及 / 或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現的分子提供增加腫瘤抗原的表現及 / 或增加 TIL 族群中腫瘤抗原特異性 T 細胞的數量，因此導致 TIL 族群的重新編程及經重

新編程之TIL族群相較於未重新編程之TIL族群的治療療效增加。

策略：

【1237】提議使用SQZ細胞內TF蛋白質遞送技術來比較各種重新編程策略產生富含腫瘤抗原特異性T細胞且具有增強治療活性的TIL產物的能力。

【1238】工作計畫包括下列要點/問題：

1. 腫瘤類型
 - 黑色素瘤
2. 最佳遞送條件
 - SQZ人T細胞優化規程+額外條件
 - 監測遞送效率
3. TF選項
 - TCF-1
 - NOTCH1/2 ICD
 - MYB
 - +/-現有iPSC雞尾酒用於「完全」重新編程?
4. 靶向TIL之活化/擴增階段
 - REP第0天
 - 其他?
5. 重新編程之動力學
 - 天數7、11、14、18...
6. 欲靶向之TIL子集

- 最初主體
- 稍後比較經分選之個別子集(TCM、TEM、TEFF、TEMRA)。

7. 培養基中需要額外因子

- IL7
- RSPO3/WNT3A
- 其他?

8. 讀數

- REP前及後TIL擴大表型分析(改良的?)項目1、2及3
 - REP後TIL效應功能評估(細胞介素及/或活化標誌產生測定)
 - REP後TIL腫瘤反應性評估(自體腫瘤細胞共培養測定)
 - TCR貯庫分析(流動式細胞測量術及/或RNA-seq)
 - 活細胞代謝測定諸如Seahorse
- 額外考量
 1. 蛋白質TF產生
 2. 腫瘤採購
 3. 後勤(細胞運送)

表 46：過程

任務
<p>優化TIL的蛋白質遞送條件：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 儲存冷凍黑色素瘤REP前樣本儲存將被用於篩選條件 ● 所遞送的測試試劑將為..... ● 條件將包括..... ● 讀數將為..... ● 選擇條件將在2至3個新鮮的REP前證實
<p>TF蛋白質產生：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 將識別一供應商且建立合約以產生足夠用於10個迷你REP規模實驗的材料 ● 將以所需純度水準製備約7種選定的TF蛋白質
<p>重新編程實驗：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 將使用最少6個有可用之自體腫瘤株的冷凍及/或新鮮的REP前樣本 ● 將使用SQZ的優化規程，遞送下列TF組合 <ul style="list-style-type: none"> ○ iPSC 雞尾酒 ○ TCF-1 ○ NOTCH1/2 ICD ○ MYB ● 將證實iPSC且使用發表條件及/或SQZ遞送以上TF企圖再分化 ● 將使用流動式細胞測量術監測隨時間之TIL重新編程 ● 將設置各條件的迷你REP 11天，在培養基使用潛在佐劑
REP後TIL之表型評估
REP後TIL之功能評估

實例 18：冷凍保存過程

【1239】此實例描述使用CryoMed控速冷凍器型號7454 (Thermo Scientific)，將實例16中所述之簡化密閉程序製備的TIL冷凍保存的過程方法。

【1240】使用的設備如下：鋁盒固定架(與CS750冷凍袋相容)、750 mL袋子的冷凍儲存盒、低壓(22 psi)液態氮瓶、冰箱、熱電偶感測器(用於袋子的帶型)及CryoStore CS750冷凍袋(OriGen Scientific)。

【1241】冷凍過程提供0.5°C速率從成核到-20°C及每分鐘1°C到-80°C終末溫度的冷卻速率。程式參數如下：步驟1 -在4°C下等待；步驟2：1.0°C/min(樣本溫度)到-4°C；

步驟 3：20.0°C /min(室溫度)到 -45°C；步驟 4：10.0°C /min(室溫度)到 -10.0°C；步驟 5：0.5°C /min(室溫度)到 -20°C；及步驟 6：1.0°C /min(樣本溫度)到 -80°C。

【1242】此實例之程序描繪係與實例 16 之過程搭配提供。

實例 19：產生富含腫瘤抗原特異性 T 細胞且具有增強治療活性的 TIL 產物之程序

第 1a 期：採購一個經驗證的用於有效且特異性靜默之 sd-RNAfm

【1243】初始期將涉及採購一個經驗證的用於有效且特異性靜默下列 3 個基因之 sd-RNAfm：PD-1(亦稱為 PDCD1)、TIM3 及 CBLB。

第 1b 期：識別用於強效靜默 LAG3 及 CISH 之序列

【1244】將設計至多 20 個用於新目標的 sd-RNA。將評估 HeLa 細胞中之外源性目標及活化初代 T 細胞中之內源性目標的基因靜默。表現水準減少超過 80% 的每個受到關注之基因(包括 PD-1 及 LAG-3)將選擇一至二個前導序列(lead)。將產生選定 sd-RNA 之經完全修飾的版本。

【1245】預期將產生一至二個 LAG3 及 CISH 特異性 sd-RNAfm。每個目標基因二個靶向 RNA 係為較佳。

第 2 期：在 REP 前 TIL 中驗證 sd-RNA 媒介之基因靜默。

【1246】將使用至多6個冷凍黑色素瘤/其他REP前細胞系來驗證sd-RNA目標(包括PD-1、TIM3、CBLB、LAG3及CISH)。條件將測試sd-RNA濃度、解凍後時間、重複/依序遞送及培養條件。讀數將為基因靜默的%，如藉由流動式及/或qPCR所評估。RNA遞送對於TIL生長及隨時間之靜默持久性的影響將藉由擴增TIL來評估。

【1247】預期80%靜默REP後24小時收集將獲得前導序列。總細胞數量將在未處理對照組的10%以內。

第3期：在過程2A中施行sd-RNA媒介之基因靜默。

【1248】基因靜默將在3至6個研究規模新鮮TIL製劑中優化。條件將測試sd-RNA濃度、時間、重複/依序遞送及培養條件。讀數將為REP後TIL中基因靜默的%，如藉由流動式及/或qPCR所評估。基因靜默對TIL表型及功能的影響將使用流動式細胞測量術測定評估。將進行可選的救援實驗及/或基因表現分析以驗證效應的特異性(例如潛在非目標靜默的程度及影響)。將選擇至少2個目標/sd-RNA對於進一步工作。接著將表徵TIL表型。將評估相當於或高於對照TIL之非特異性及特異性TIL活性以判定最佳目標/sd-RNA。

第4期：在完整規模TIL製備中施行優化靜默規程。

每個目標基因將執行一次完整規模TIL製備。除了放行所需者外，將開發具有第3期定義之新特徵的TIL產物。

實例 20：例示性 SD-RNA 製備及用途

sd-RNA 設計

【1249】一給定目標將產生大約 2 至 20 個 sd-RNA 序列。在一些情況下，將基於根據超過 500 個 sd-RNA 序列功能篩選設計之選擇演算法(可購自 Advirna LLC, Worcester, MA, USA)選擇 sd-RNA 序列。將使用回歸分析建立特定核苷酸及 sd-RNA 雙股中任何特定位置之修飾的發生頻率與其在基因抑制測定中之功能性之間的相關性。選定序列將藉由商業途徑合成(例如藉由 TriLink Biotechnologies)為 0.2- μ mole 規模且溶解於無菌之無 RNase、無 DNA 酶注射用水(可購自 CalBiochem, 4.86505)。雙股可藉由加熱至 95°C 達 5 min 且逐漸冷卻至室溫黏合。

sd-RNA 直接遞送(被動攝取)

【1250】寡核苷酸(包括本文所述之 sd-RNA 靶向基因)可用無血清介質稀釋且以三重複分配至 96 孔培養盤。可將細胞接種於含有減少 FBS 之適當培養基與預稀釋化合物之板中達所示之時間。HeLa 細胞可以 10,000 個細胞/孔轉染於含有 3% FBS 之 EMEM 介質中。初代人 T 細胞(AllCells, CA)可培養於含有 500 IU/ml IL2 (ProSpec)之完全 AIM-V (Gibco)介質中。根據廠商指示在轉染前至少 4 天將細胞用抗 CD3/CD28 Dynabeads (Gibco, 11131)活化。T 細胞可在不移除 Dynabeads 下以 100,000 個細胞/孔在 5% FBS 中轉染，

除非另外指明。可使用Olympus BX-60顯微鏡自經Cy3接合之sd-RNA轉染之活細胞獲得螢光影像以證實轉染效率。可藉由使用Hoechst 33342 (Molecular Probes, H1398)添加至轉染細胞30分鐘及影像處理來獲得核染色。

前導序列sd-RNA化合物識別

【1251】實例18描述的前導序列可使用此規程識別。可藉由將PDCD1靶向區域插入psiCheck2質體 (Promega, C8021)中Renilla螢光素酶序列下游來建構螢光素酶報導子質體。為了進行比較，可將先前經驗證之MAP4K4 sd-RNA序列插入作為陽性對照。

【1252】為了進行篩選，可根據廠商指示使用Fugene HD (Promega, E2311)將HeLa細胞用經選殖之質體轉染。簡言之，可將細胞以 2.5×10^6 個細胞/10 cm² 390培養皿接種於不含抗生素之EMEM (ATCC, 30-2003)介質中且稍後用質體以2.5 : 1 FuGENE : DNA比例轉染6小時。細胞可孵養16至18 hrs、用PBS洗滌3次、經胰蛋白酶處理且與預稀釋之sd-RNA化合物以最終濃度1 μM sd-RNA/10,000個細胞/100 μl含3% FBS之EMEM接種至96孔板。細胞可用sd-RNA處理48 h以促進被動細胞攝取化合物、用Glo溶解緩衝液 (Promega, E266A)溶解且可測定Renilla及Firefly螢光素酶之表現。為此，將20 μl等分試樣的各溶解物添加至雙份不透光96孔板且與Matthews (Renilla)測定緩衝液 59 397或Firefly螢光素酶398測定緩衝液(25 mM甘胺醯甘胺酸、15

mM MgSO₄、4 mM EGTA、1 mM DTT、2 mM ATP、15 mM 399 K₂PO₄ pH 7.8及1 mM D-螢光素)混合。受質D-螢光素 (Promega, E1605)及h-腔腸素 (NanoLight, 301)在馬上要使用前添加。發光可在 SpectraMax i3 (Molecular Devices)上測量、經標準化 (Renilla/Firefly)且表示為未處理對照百分比。

藉由qPCR之mRNA定量

【 1253 】 總 RNA 可根據廠商建議使用 PureLink™ Pro96純化套組 (Invitrogen, 12173-011A)自轉染細胞單離。可製備 1:5及 1:25之非轉染 (NT)細胞用於產生標準曲線。基因表現係於一步驟多目標 (multiplex)qPCR 407中藉由在相同反應中混合 20至 40 ng經純化之 RNA與 Quanta qScript RT-qPCR ToughMix (VWR, 89236672)及 Taqman探針 - PDCD1-FAM (Taqman, Hs01550088_m1) 及 GAPDH-VIC (Applied Biosystems, 4326317E)來分析。樣本可使用 Quanta建議設定在 StepOnePlus qPCR 機器 (Applied Biosystems)中擴增。PDCD1表現可標準化至 GAPDH、調整至標準曲線且表示為非靶向對照 (NTC)轉染細胞的百分比。

細胞存活性測定

【 1254 】 根據本發明經擴增的 TIL可用各種劑量的 sd-RNA寡核苷酸轉染 72 h。將細胞洗滌且用 1:10稀釋的 CellTiter-Blue試劑 (Promega, G808A)在 37C下孵養 1 h。將

板放至室溫下且以 530 nm ex/590 nm em 記錄螢光。線性範圍可藉由以相同條件接種 4 系列的 2 倍細胞稀釋及螢光讀數作圖來證實。

腫瘤浸潤淋巴球單離

【1255】腫瘤浸潤淋巴球可如本文所述製備，例如圖 8 以及圖 14 所概述。

TIL 擴增

【1256】TIL 可如本文所述接種於培養瓶中且執行第一及/或第二擴增步驟。sd-RNA 可在第一擴增期間例如步驟 b、在第一擴增之後例如在步驟 C 期間、在第二擴增之前或期間例如在步驟 D 之前或期間、在步驟 D 之後且在步驟 E 的收集之前、在步驟 F 的收集期間或之後、在步驟 F 的最終調配及/或轉移至輸注袋之前或期間以及在步驟 F 的任何可選的冷凍保存步驟之前添加。另外，sd-RNA 可在自步驟 F 的任何冷凍保存步驟解凍之後添加。

胸苷併入測定

【1257】TIL 樣本可在任何擴增步驟期間收集且以三重重複接種在 96 孔板 (104 443 個細胞/孔) 上的補充有 2% 人 AB 血清之 CellGro 介質中。在 1 小時後，可將 1 μ Ci/孔的 [甲基-3444 H] 胸苷 (PerkinElmer, Waltham, MA) 添加至各孔且孵養四小時。接著可收集細胞且可在 Trilux 1450 microBeta

液體閃爍計數器 (Wallac) 中測量 ^3H -胸苷併入以檢查 TIL 生長。

sd-RNA 處理細胞之 IFN- γ 分泌

【1258】經刺激之 T 細胞的 IFN- γ 產生可如廠商指示使用人 IFN- γ ELISA 發展套組 (Mabtech) 在上清液中測量。TIL 可如本文中提供製備且用例如 2 μM sd-RNA 處理數天，在一些情況下處理四天。在此期間之後，可收集上清液用於 ELISA 分析以判定 IFN- γ 產生水準。

TIL 治療

【1259】可如本文所述採用經 sd-RNA 處理之 TIL 於用於治療癌症患者之方法。

實例 21：例示性電穿孔方法

【1260】TIL 係根據本文所述之任何方法製備。將測試下列轉染方法：lipofectin 及 Lipofectamin 脂質體轉染、使用方波 BTX ECM 830 設備或 Bio-Rad 基因脈衝產生器 II 之電穿孔、使用 Eppendorf Multiporator 之指數衰退波電穿孔及 Amaxa 核轉染系統 (nucleofector)。所有方法最初將基於廠商建議且視需要進行潛在修改。Amaxa 核轉染規程可給予最高的轉染效率。Amaxa 程序將使用三種溶液 (V、R 及 T) 中的一種與 8 種電穿孔程式之不同組合優化。亦見美國專利申請案號 2016/0230188 及美國專利第 8,859,229 號中描

述之方法，兩者全文皆以引用方式併入本文中。電穿孔亦可根據 Menger et al., *Cancer Res.*, 2016 Apr 15; 76(8): 2087-93(其揭露以引用方式併入本文中)所述之方法，使用 Agile Pulse BTX系統(Harvard Apparatus)進行。經電穿孔之細胞可藉由在本文他處描述之 REP前及 REP方法擴增。亦可使用所屬技術領域中已知之電穿孔方法，諸如該些描述於美國專利第 6,010,613 及 6,078,490 號，彼等之揭露以引用方式併入本文中。脈衝電穿孔優化可使用所述之方法執行且使用該方法之下列程式或修改：

程式	第1組				第2組				第3組			
	脈衝	V	持續時間 (ms)	間隔 (ms)	脈衝	V	持續時間 (ms)	間隔 (ms)	脈衝	V	持續時間 (ms)	間隔 (ms)
1	1	600	0.1	0.2	1	600	0.1	100	4	130	0.2	2
2	1	900	0.1	0.2	1	900	0.1	100	4	130	0.2	2
3	1	1200	0.1	0.2	1	1200	0.1	100	4	130	0.2	2
4	1	1200	0.1	10	1	900	0.1	100	4	130	0.2	2
5	1	900	0.1	20	1	600	0.1	100	4	130	0.2	2

【1261】 TIL可在 0.4 cm間隙樣品管中(大約為約 10^6 個細胞/mL)以約 20 μ g的編碼 GFP之質體及對照質體 pUC使用不同的電穿孔程式或方法電穿孔。在電穿孔後約 24小時，藉由流動式細胞測量術分析電穿孔細胞中的 GFP表現來判定轉染效率。在 TIL中質體電穿孔所需之最小電壓先前已報告於國際專利申請公開案號 WO 2014/184744及美國專利申請公開案號 US 2013/0315884 A1，彼等揭露以引用方式併入本文中。

實例 22：製備富含腫瘤抗原特異性 T 細胞且具有增強治療活性的 TIL 產物之暫時性轉染規程

【1262】此實例中的實驗將研究二種不同 TIL 改善策略的效應。策略 1：暫時性表現 IL-2 或膜結合形式的 IL-15 (mb-IL15)。策略 2：NOTCH 媒介之 TIL 重新編程。在一些實施態樣中，NOTCH 媒介之重新編程包括 NOTCH1 或 NOTCH2 之細胞內結構域 (ICD) 的 mRNA 表現。在一些實施態樣中，NOTCH 媒介之重新編程包括 NOTCH 配體 DLL1 的 mRNA 表現。

【1263】所研究的腫瘤類型將為黑色素瘤、肺腫瘤、肉瘤及其他。

【1264】將使用如本文以上所述之過程產製 TIL，包括例如在實例 16 中描述之過程。

【1265】RNA 分子將使用例如實例 21 所述之方法遞送 (亦見美國專利申請案號 2016/0230188 及美國專利第 8,859,229 號中描述之方法，兩者全文皆以引用方式併入本文中)。

【1266】將判定遞送條件，包括例如 mRNA 試劑驗證、暫時轉染及重新編程之時間、電穿孔時間與所使用之 TIL 過程的相容性、效率 (包括轉染效率) 及規模可擴充性。

【1267】實驗讀數將包括 TIL 表型 (流動式細胞測量術)、TIL 效應功能 (細胞介素產生測定)、TIL 腫瘤反應性 (自體腫瘤細胞共培養測定)、TCR 貯庫分析 (流動式細胞測

量術及/或 RNA-seq)及 TIL 代謝狀態(活細胞代謝測定諸如 Seahorse)或任何其他本文上述之參數。

預期結果：

【1268】遞送條件將視需要設計以導致受到關注之蛋白質在 REP 後 TIL 中的高表現。冷凍黑色素瘤 REP 前樣本將被用於篩選條件。為了優化實驗所遞送的試劑將為 GFP mRNA。條件將測試數種 TIL 活化方法及電穿孔規程。讀數將為細胞存活性及相對於非電穿孔對照組的 GFP 陽性細胞%，如流動式細胞測量術所評估。選擇條件將在可用組織學之 2 至 3 個新鮮 TIL 製劑證實。在一些實施態樣中，轉染效率(ET)可在轉染後大約 3、6、9、12、15 及/或 18 小時藉由螢光激活細胞分選(FACS)判定。在一些實驗中，可進一步每 12 小時至 24 小時分析一次轉染細胞直到無法偵測到 GFP 為止。在一些實施態樣中，細胞存活性可藉由台盼藍染料排除判定。預期此規程將導致 >80% 存活性及 >70% 轉染效率。

【1269】將產生人 IL-2 及 mb 結合之 IL-15 mRNA 且測試功能。將使用經驗證條件轉染來自各種組織學之至多 6 個 TIL 培養。讀數將為轉染效率、TIL 表型及 TIL 效應功能。預期此規程將導致 >80% 存活性、>70% 轉染效率、相對於對照組可相比或改良的 TIL 表型及顯著增加的 TIL 效應功能。

【1270】遞送條件將視需要設計以導致 T 細胞重新編

程。儲存在Iovance之冷凍黑色素瘤REP前樣本將被用於篩選條件。所遞送的試劑將為NOTCH1或2 ICD mRNA。條件將測試數種TIL活化方法及電穿孔時間。讀數將為細胞存活性、轉染效率及相對於非電穿孔對照組的幹記憶T細胞(TSCM)%，如流動式細胞測量術所評估。選擇條件將在可用組織學之2至3個新鮮TIL製劑證實。預期此規程將導致>80%存活性、>70%轉染效率及顯著增加的TSCM頻率。

【1271】重新編程實驗將在來自各種組織學之至多6個TIL製劑上使用以上判定之轉染條件執行。讀數將為轉染效率、TIL表型、TCR貯庫及TIL效應功能。預期此規程將導致顯著增加的TSCM頻率、將允許維持TSCM子集相對於全TIL之TCR貯庫且將允許維持相對於對照組的效應功能。

實例 23：採購及驗證SD-RXRNA

【1272】此實例中的實驗提供關於5個關注目標之sd-rxRNA建構體的資料：PDCD1、TIM3、CBLB、LAG3及CISH。

【1273】第1期：採購5個關注目標之sd-rxRNA。

【1274】第2期：在REP前TIL中(8週)驗證sd-rxRNA媒介之基因靜默。

【1275】至多6個冷凍黑色素瘤/其他REP前細胞系。判定實驗條件。

【1276】讀數：

- 靜默%：≥ 80%預期

- 靜默持久性
- TIL生長：預期在對照組的10%以內
- TIL功能：預期增加細胞介素產生

【1277】第3期：在第2及/或3代過程(3個月)中施行sd-rxRNA媒介之基因靜默

- 3至6個研究規模之新鮮TIL製劑
- 如上之相同讀數
- TIL表型
- TIL腫瘤反應性
- 將選擇至少2個目標/sd-rxRNA對用於進一步工作

【1278】第4期：在完整規模TIL製備(8週)中施行優化靜默規程。

- 每個目標基因一個完整規模製備。

原理：

【1279】在TME中，TIL表現數種負面調節彼等之效應功能的抑制分子。

【1280】當離體培養TIL時可恢復功能性，但在重新輸注後將再次遭遇免疫抑制。

【1281】確保T細胞抑制途徑在重新輸注後維持靜默至少數天可改善TIL用於ACT的效力。

【1282】自我遞送siRNA (sd-rxRNA)提供敲低T細胞基因之有效方法。見例如Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, 26(6):1482-1493 (2018)。

目標：

【 1283 】 藉由靜默抑制途徑來重新建立 TIL 效應功能。

策略：

【 1284 】 在快速擴增規程期間使用 sd-rxRNA 暫時性敲低 1)PDCD1、2)TIM3、3)CBLB、4)LAG3 及 5)CISH。特別注意在快速擴增規程期間使用 sd-rxRNA 暫時性敲低 PD1。

程序：

【 1285 】 在經 REP 之 TIL 中驗證 sd-rxRNA 媒介之基因靜默 (KD 效率及持久性；T 細胞存活性)。

【 1286 】 基因靜默對 TIL 表型及功能 (腫瘤反應性) 的影響。

結果摘要

【 1287 】 在 REP 期間添加 sd-rxRNA 導致成功基因 KD 5 個目標中的 3 個，包括高於 80% (>80%) 的 PD1 敲低。

- PD1：>80%
- TIM3：~70%
- LAG3：~70%
- CISH：~40%
- CBLB：無法偵測

【1288】PD1 KD(敲低)與降低存活性相關。PD1 KD與降低TIL擴增相關。

【1289】顯著表型改變與PD1及TIM3 KD相關，暗示較高活化水準(增強CD25、CCR7、CD56、4-1BB及OX40表現)。特別是，顯著表型改變與PD1 KD相關，暗示高活化水準(相對於NTC對照組增強CD25、CCR7、4-1BB及OX40表現)。

【1290】在這些實驗中沒有sd-rxRNA導致因應再刺激(INF g/IL-2/TNF-a)的增加細胞介素分泌。特別是，TIL暴露至PDCD1 sd-rxRNA不增加因應再刺激之CD107a移動或細胞介素分泌(INF γ /IL-2/TNF- α)。見例如圖54。

【1291】PD1 KD(敲低)增加TIL的體外殺滅能力(見例如圖49)。

方法：

- 第0天：REP前起始。添加介質加上IL-2。
- 第11天：REP起始解凍/新鮮REP前+ sd-rxRNA(即第二擴增起始)，介質包含IL-2加上PBMC
- 第14天：介質更換+ sd-rxRNA，含有IL-2、OKT及餵養細胞(PBMC)。
- 第17天：介質更換+ sd-rxRNA(添加額外sd-rxRNA)
- 第21天：介質更換+ sd-rxRNA(添加額外sd-rxRNA)
- 第22天：如上述收集TIL。
 - 細胞計數及判定存活性。
 - 判定KD(敲低)效率(Q-PCR，流動式)

- 如上述執行表型測定以表徵 TIL。
- 檢查活化標誌 (CD107a、IFN γ) (見例如圖 45 抑制 / 耗竭標誌及圖 46 IFN γ)。

【1292】如圖 40 所提供的，此實驗在五種腫瘤類型中執行：黑色素瘤、乳房、肺、肉瘤及卵巢。

實例 24：實例 23 的變體實施態樣

【1293】根據在實例 23 中討論的方法，描述擴增 TIL 同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例 23 所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1294】在上述方法之一些實施態樣中，用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法可包含：

- (i) 自患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；
- (ii) 藉由在包含 IL-2 及視需要 OKT-3 之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群來執行第一擴增以產生第二 TIL 族群；
- (iii) 藉由用額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 補充該第二 TIL 族群之細胞培養基來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群於數量上高於該第二 TIL 族群至少 100 倍，且其中該第二擴增執行至少 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群；及
- (iv) 使該第二及 / 或第三 TIL 族群在第 11 天與第 21 天之間暴露至轉錄因子 (TF) 及 / 或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該 TF 及 / 或其他能夠暫時性改變蛋白質

表現的分子提供該治療性TIL族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞的數量；及

(v) 在第22天或之後收集獲自步驟(iv)之治療性TIL族群，其中；且

【1295】(vi) 視需要，將自步驟(v)收集的TIL族群轉移至輸注袋。在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含sd-RNA，包括例如但不限於sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天暴露至sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本

發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的

濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1296】 在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的 PD-1 表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現

80%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現99%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 至約10 μM (在一些實施態樣中約0.25 μM 至約4 μM)的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用

之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1297】 在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第

14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1298】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1299】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-

RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1300】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約2 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1301】在一些實施態樣中，在第11天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA、IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)之介質中。在一些實施態樣中，在第14天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第17天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第21天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施

態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

實例 25：實例 23 的變體實施態樣

【1302】根據在實例 23 中討論的方法，描述擴增 TIL 同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例 23 所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1303】在上述方法之一些實施態樣中，用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法可包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

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

(d) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系

統而發生；

(e) 使該第二及/或第三TIL族群在第11天與第21天之間暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性TIL族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞的數量；

(f) 在第22天或之後收集獲自步驟(d)之該治療性TIL族群，其中自步驟(d)轉變至步驟(e)無需打開該系統而發生；及

(g) 將得自步驟(e)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(e)轉移至步驟(f)無需打開該系統而發生。

【1304】 在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含sd-RNA，包括例如但不限於sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天暴露至sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1305】 在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，

本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 85% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃

度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-

RNA序列當以約10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的TIL培養基判定。

【1306】在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的PD-1表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現99%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 至約10 μM (在一些實施態樣中約0.25 μM 至約4 μM)的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明

使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當

以約8.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約9.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約10.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的TIL培養基判定。

【1307】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1308】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同

介質更換以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1309】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1310】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天以 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1311】在一些實施態樣中，在第 11 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA、IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC) 之介質中。在一些實施態樣中，在第 14 天添加的 sd-RNA

係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第 17 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第 21 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

實例 26：實例 23 的變體實施態樣

【1312】根據在實例 23 中討論的方法，描述擴增 TIL 同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例 23 所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1313】在上述方法之一些實施態樣中，提供用於治療癌症個體之方法且該方法包含投予經擴增的腫瘤浸潤淋巴球(TIL)，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自個體所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含 IL-2 及視需要 OKT-3 之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群來執行第一擴增以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約 3 至 14 天以獲得第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至

少 50 倍，且其中自步驟 (b) 轉變至步驟 (c) 無需打開該系統而發生；

(d) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二及 / 或第三 TIL 族群在第 11 天與第 21 天之間暴露至轉錄因子 (TF) 及 / 或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該 TF 及 / 或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性 TIL 族群中增加的腫瘤抗原表現及 / 或增加腫瘤抗原特異性 T 細胞的數量；

(f) 收集獲自步驟 (d) 之該治療性 TIL 族群，其中自步驟 (d) 轉變至步驟 (e) 無需打開該系統而發生；及

(g) 將得自步驟 (e) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (e) 轉移至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(h) 使用冷凍保存過程將包含步驟 (f) 之該經收集的 TIL 族群之該輸注袋視需要冷凍保存；及

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

【 1314 】 在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改

變蛋白質表現的分子包含 sd-RNA，包括例如但不限於 sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天暴露至 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1315】在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 85% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之

sd-RNA序列當以約0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一

些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1316】 在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的 PD-1 表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 85% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣

中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現

PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約4.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約5.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約6.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約7.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約8.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約9.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約10.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的TIL培養基判定。

【1317】 在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度

暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1318】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1319】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1320】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第

14天、第17天及/或第21天中之至少二天以2 μ M的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約2 μ M的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約2 μ M的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約2 μ M的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1321】在一些實施態樣中，在第11天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA、IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)之介質中。在一些實施態樣中，在第14天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第17天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第21天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

實例27：實例23的變體實施態樣

【1322】根據在實例23中討論的方法，描述擴增TIL同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例23所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1323】在上述方法之一些實施態樣中，可提供一種用於治療癌症個體之經擴增的TIL族群，其中該經擴增的TIL族群係可藉由方法獲得之第三TIL族群，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自個體所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

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

(d) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二及/或第三TIL族群在第11天與第21天之間暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性TIL族群中增加的腫瘤抗原表現

及/或增加腫瘤抗原特異性T細胞的數量；

(f) 收集獲自步驟(d)之該治療性TIL族群，其中自步驟(e)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；及

(g) 將得自步驟(e)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(f)轉移至步驟(g)無需打開該系統而發生；及

(h) 使用冷凍保存過程將包含步驟(f)之該經收集的TIL族群之該輸注袋視需要冷凍保存。

【1324】 在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含sd-RNA，包括例如但不限於sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天暴露至sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1325】 在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的目標基因表現減少。在一些實

施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現

減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【 1326 】 在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA

序列展現70%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的PD-1表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 至約10 μM (在一些實施態樣中約0.25 μM 至約4 μM)的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.0 μM 的

濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約4.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約5.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約6.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約7.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約8.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約9.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約10.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在任何

前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的TIL培養基判定。

【1327】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1328】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1329】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.5 μM 至約

2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少三天以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1330】 在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少二天以 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少三天以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1331】 在一些實施態樣中，在第 11 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA、IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)之介質中。在一些實施態樣中，在第 14 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第 17 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)中之一或

多者之介質中。在一些實施態樣中，在第21天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

實例28：實例23的變體實施態樣

【1332】根據在實例23中討論的方法，描述擴增TIL同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例23所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1333】在上述方法之一些實施態樣中，提供用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d) 添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二TIL族群靜置約1天；

(f) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二 TIL 族群在步驟 (d)、(e) 及 / 或 (f) 之任一者的期間 (包括介於第 11 與 21 天之間) 與至少一種 sd-RNA 接觸，其中該 sd-RNA 係以 0.1 μM sd-RNA、0.5 μM sd-RNA、0.75 μM sd-RNA、1 μM sd-RNA、1.25 μM sd-RNA、1.5 μM sd-RNA、2 μM sd-RNA、5 μM sd-RNA 或 10 μM sd-RNA 之濃度添加，且其中該 sd-RNA 係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 及其組合所組成之群組的分子表現；

(h) 視需要對該第二 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(i) 收集獲自步驟 (g) 或 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (g) 轉變至步驟 (i) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；及

(j) 將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (i) 轉移至步驟 (j) 無需打開該系統而發生。

【1334】 在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含 sd-RNA，包括例如但不限於 sd-

rxRNA。在一些實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天暴露至sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1335】在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現99%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 至約10 μM (在一些實施態樣中約0.25 μM 至約4 μM)的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現

減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的

濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1336】 在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的 PD-1 表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 85% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實

施態樣中約0.25 μM 至約4 μM)的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以

約 3.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1337】 在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換

以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1338】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1339】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1340】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以2 μM 的sd-RNA

濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1341】在一些實施態樣中，在第 11 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA、IL-2、OKT3 及 APC (包括例如 PBMC) 之介質中。在一些實施態樣中，在第 14 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC (包括例如 PBMC) 中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第 17 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC (包括例如 PBMC) 中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第 21 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC (包括例如 PBMC) 中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

實例 29：實例 23 的變體實施態樣

【1342】根據在實例 23 中討論的方法，描述擴增 TIL 同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例 23 所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1343】在上述方法之一些實施態樣中，提供用於擴

增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含 IL-2 及視需要包含 4-1BB 促效抗體之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群約 2 至 5 天來執行第一擴增；

(d) 添加 OKT-3 以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約 1 至 3 天以獲得該第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二 TIL 族群靜置約 1 天；

(f) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二 TIL 族群在步驟 (d)、(e) 及 / 或 (f) 之任一者的期間 (包括介於第 11 與 21 天之間) 與至少一種 sd-RNA 接觸，其中該 sd-RNA 係以 2 μ M sd-RNA 之濃度添加，且其中該 sd-RNA 係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH

及 CBLB 及其組合所組成之群組的分子表現；

(h) 視需要對該第二 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(i) 收集獲自步驟 (g) 或 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (g) 轉變至步驟 (i) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；及

(j) 將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (i) 轉移至步驟 (j) 無需打開該系統而發生。

【1344】在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含 sd-RNA，包括例如但不限於 sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天暴露至 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1345】在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使

用之 sd-RNA 序列展現 85% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之

sd-RNA序列當以約2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的TIL培養基判定。

【1346】 在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的 PD-1 表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 85% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一

些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用

之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1347】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少二天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少三天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1348】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少二天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少三天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1349】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第

14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1350】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約2 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1351】在一些實施態樣中，在第11天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA、IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)之介質中。在一些實施態樣中，在第14天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第17天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需

要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第 21 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

實例 30：實例 23 的變體實施態樣

【1352】根據在實例 23 中討論的方法，描述擴增 TIL 同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例 23 所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1353】在上述方法之一些實施態樣中，提供用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 或治療性 TIL 族群之方法，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含 IL-2 及視需要包含 4-1BB 促效抗體之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群約 2 至 5 天來執行第一擴增；

(d) 添加 OKT-3 以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約 1 至 3 天以獲得該第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二 TIL 族群靜置約 1 天；

(f) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二 TIL 族群在步驟 (d)、(e) 及 / 或 (f) 之任一者的期間 (包括介於第 11 與 21 天之間) 與至少一種 sd-RNA 接觸，其中該 sd-RNA 係以 0.1 μM sd-RNA、0.5 μM sd-RNA、0.75 μM sd-RNA、1 μM sd-RNA、1.25 μM sd-RNA、1.5 μM sd-RNA、2 μM sd-RNA、5 μM sd-RNA 或 10 μM sd-RNA 之濃度添加，且其中該 sd-RNA 係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 及其組合所組成之群組的分子表現；

(h) 視需要對該第二 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(i) 收集獲自步驟 (g) 或 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (g) 轉變至步驟 (i) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(j) 將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (i) 轉移至步驟 (j) 無需打開該系統而發生；
及

(k) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群。

【1354】在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含sd-RNA，包括例如但不限於sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天暴露至sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1355】在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現99%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 至約10 μM (在一些實施態樣中約0.25 μM 至約4 μM)的濃

度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之

sd-RNA序列當以約3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的TIL培養基判定。

【1356】 在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的PD-1表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的PD-1表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣

中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1357】 在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少二天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少

三天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1358】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1359】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同

介質更換以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1360】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少二天以 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少三天以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1361】在一些實施態樣中，在第 11 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA、IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC) 之介質中。在一些實施態樣中，在第 14 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC) 中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第 17 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC) 中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第 21 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC) 中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

實例 31：實例 23 的變體實施態樣

【1362】根據在實例23中討論的方法，描述擴增TIL同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例23所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1363】在上述方法之一些實施態樣中，提供用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d) 使該第一TIL族群在介於第11與21天之間與至少一種sd-RNA接觸，其中該sd-RNA係以0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、2 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、5 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質或10 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質之濃度添加，且其中該sd-RNA係用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB及其組合所組成之群組的分子表現；

(e) 視需要對該第一TIL族群執行無菌電穿孔步驟，

其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種sd-RNA之轉移；

(f) 添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二TIL族群靜置約1天；

(h) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(c)轉變至步驟(h)無需打開該系統而發生；

(i) 收集獲自步驟(h)的該治療性TIL族群以提供經收集的TIL族群，其中自步驟(h)轉變至步驟(i)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(j) 將得自步驟(i)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(i)轉移至步驟(j)無需打開該系統而發生；及

(k) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群。

【1364】 在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含sd-RNA，包括例如但不限於sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第

17天及/或第21天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天暴露至sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1365】在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現99%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 至約10 μM (在一些實施態樣中約0.25 μM 至約4 μM)的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當

以約0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，

本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1366】 在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的 PD-1 表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 85% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減

少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發

明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1367】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少二天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少三天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些

實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1368】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1369】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1370】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11

天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約2 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1371】在一些實施態樣中，在第11天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA、IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)之介質中。在一些實施態樣中，在第14天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第17天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第21天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

實例32：實例23的變體實施態樣

【1372】根據在實例23中討論的方法，描述擴增TIL同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例23所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1373】在上述方法之一些實施態樣中，提供用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)或治療性TIL族群之方法，該方法

包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含 IL-2 及視需要包含 4-1BB 促效抗體之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群約 2 至 5 天來執行第一擴增；

(d) 使該第一 TIL 族群在介於第 11 與 21 天之間與至少一種 sd-RNA 接觸，其中該 sd-RNA 係以 0.1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、2 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL 或 10 μM sd-RNA/10,000 個 TIL 之濃度添加，且其中該 sd-RNA 係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 及其組合所組成之群組的分子表現；

(e) 視需要對該第一 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(f) 添加 OKT-3 以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約 1 至 3 天以獲得該第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二 TIL 族群靜置約 1 天；

(h) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (g) 轉變至步驟 (h) 無需打開該系統而發生；

(i) 收集獲自步驟 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (h) 轉變至步驟 (i) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(j) 將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (i) 轉移至步驟 (j) 無需打開該系統而發生；及

(k) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的 TIL 族群。

【1374】 在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含 sd-RNA，包括例如但不限於 sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天暴露至 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1375】 在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 85% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當

以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本

發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1376】在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的 PD-1 表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 85% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實

施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用

之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1377】 在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少二天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少三天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1378】 在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少二天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少三天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、

第17天及第21天中之所有天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1379】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1380】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約2 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1381】在一些實施態樣中，在第11天添加的sd-RNA

係添加於包含 sd-RNA、IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)之介質中。在一些實施態樣中，在第14天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第17天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第21天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

實例33：實例23的變體實施態樣

【1382】 根據在實例23中討論的方法，描述擴增TIL同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例23所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1383】 在上述方法之一些實施態樣中，提供用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)或治療性TIL族群之方法，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d) 添加 OKT-3 以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約 1 至 3 天以獲得該第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二 TIL 族群靜置約 1 天；

(f) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二 TIL 族群在步驟 (d)、(e) 及 / 或 (f) 之任一者的期間 (包括介於第 11 與 21 天之間) 與至少一種 sd-RNA 接觸，其中該 sd-RNA 係以 0.1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、0.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、0.75 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、1.25 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、1.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、2 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質或 10 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質之濃度添加，且其中該 sd-RNA 係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 及其組合所組成之群組的分子表現；

(h) 視需要對該第二 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(i) 收集獲自步驟 (g) 或 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (g) 轉變至步驟 (i) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(j) 將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (i) 轉移至步驟 (j) 無需打開該系統而發生；及

(k) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的 TIL 族群。

【1384】在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含 sd-RNA，包括例如但不限於 sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天暴露至 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1385】在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 85% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，

本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現

減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的TIL培養基判定。

【1386】在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的PD-1表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現99%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 至約10 μM (在一些實施態樣中約0.25 μM 至約4 μM)的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1

表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施

態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1387】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 0.75 μM 至約 3 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1388】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少二天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及 / 或第 21 天中之至少三天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 1.0 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-

RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1389】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1390】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約2 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1391】在一些實施態樣中，在第11天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA、IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)之介質中。在一些實施態樣中，在第14天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及

APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第17天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第21天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

實例34：實例23的變體實施態樣

【1392】根據在實例23中討論的方法，描述擴增TIL同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例23所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1393】在上述方法之一些實施態樣中，提供用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)或治療性TIL族群之方法，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d) 添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該

第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二 TIL 族群靜置約 1 天；

(f) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二 TIL 族群在步驟 (d)、(e) 及 / 或 (f) 之任一者的期間 (包括介於第 11 與 21 天之間) 與至少一種 sd-RNA 接觸，其中該 sd-RNA 係以 0.1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、0.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、0.75 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、1.25 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、1.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、2 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質或 10 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質之濃度添加，且其中該 sd-RNA 係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 及其組合所組成之群組的分子表現；

(h) 視需要對該第二 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(i) 收集獲自步驟 (g) 或 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供

經收集的TIL族群，其中自步驟(g)轉變至步驟(i)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(j) 將得自步驟(i)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(i)轉移至步驟(j)無需打開該系統而發生；及

(k) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群。

【1394】 在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含sd-RNA，包括例如但不限於sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天暴露至sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1395】 在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的目標基因表現減少。在一些實

施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現

減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.25 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【 1396 】 在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA

序列展現70%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的PD-1表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 至約10 μM (在一些實施態樣中約0.25 μM 至約4 μM)的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約1.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.0 μM 的

濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約2.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約4.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約5.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約6.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約7.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約8.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約9.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約10.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現

減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的TIL培養基判定。

【1397】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1398】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1399】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.5 μM 至約

2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少三天以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 1.5 μM 至約 2.5 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1400】在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少二天以 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及/或第 21 天中之至少三天以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL 在第 11 天、第 14 天、第 17 天及第 21 天中之所有天以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度暴露至 sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約 2 μM 的 sd-RNA 濃度添加 sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA 靶向 PD-1。

【1401】在一些實施態樣中，在第 11 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA、IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)之介質中。在一些實施態樣中，在第 14 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第 17 天添加的 sd-RNA 係添加於包含 sd-RNA 且視需要包括 IL-2、OKT3 及 APC(包括例如 PBMC)中之一或

多者之介質中。在一些實施態樣中，在第21天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

實例35：實例23的變體實施態樣

【1402】根據在實例23中討論的方法，描述擴增TIL同時暫時性改變蛋白質表現的方法。此實例提供與實例23所述之方法一致的進一步變化實施態樣。

【1403】在上述方法之一些實施態樣中，提供用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d) 添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二TIL族群靜置約1天；

(f) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (e) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；

(g) 使該第二 TIL 族群在步驟 (d)、(e) 及 / 或 (f) 之任一者的期間 (包括介於第 11 與 21 天之間) 與至少一種 sd-RNA 接觸，其中該 sd-RNA 係以 0.1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、1 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、2 μM sd-RNA/10,000 個 TIL、5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL 或 10 μM sd-RNA/10,000 個 TIL 之濃度添加，且其中該 sd-RNA 係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 及其組合所組成之群組的分子表現；

(h) 視需要對該第二 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(i) 收集獲自步驟 (g) 或 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (e) 轉變至步驟 (h) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(j) 將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (h) 轉移至步驟 (i) 無需打開該系統而發

生；及

(k) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群。

【1404】在一些變體實施態樣中，其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子包含sd-RNA，包括例如但不限於sd-rxRNA。在一些實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天暴露至sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1405】在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現70%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現75%的目標基因表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現80%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現85%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現90%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現95%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列展現99%的目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約0.25

μM 至約 $10 \mu\text{M}$ (在一些實施態樣中約 $0.25 \mu\text{M}$ 至約 $4 \mu\text{M}$)的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $0.25 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $0.5 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $0.75 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $1.0 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $1.25 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $1.5 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $1.75 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $2.0 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $2.25 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $2.5 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $2.75 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $3.0 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約 $3.25 \mu\text{M}$ 的濃度遞送時展

現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.5 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 3.75 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 4.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 5.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 6.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 7.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 8.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 9.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 10.0 μM 的濃度遞送時展現目標基因表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的 TIL 培養基判定。

【1406】 在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 70% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 75% 的 PD-1 表現減少。

在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 80% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 85% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣

中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 90% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 95% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列展現 99% 的 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 至約 10 μM (在一些實施態樣中約 0.25 μM 至約 4 μM) 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 0.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 1.75 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.0 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.25 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.5 μM 的濃度遞送時展現 PD-1 表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之 sd-RNA 序列當以約 2.75 μM 的濃

度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.25 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.5 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約3.75 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約4.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約5.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約6.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約7.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約8.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在一些實施態樣中，本發明使用之sd-RNA序列當以約9.0 μM 的濃度遞送時展現PD-1表現減少。在任何前述實施態樣中，所指明之濃度可就交換介質之前或之後的TIL培養基判定。

【1407】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣

中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約0.75 μM 至約3 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1408】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.0 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1409】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-

RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約1.5 μM 至約2.5 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1410】在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少二天以2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及/或第21天中之至少三天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，TIL在第11天、第14天、第17天及第21天中之所有天以約2 μM 的sd-RNA濃度暴露至sd-RNA。在一些變體實施態樣中，連同介質更換以約2 μM 的sd-RNA濃度添加sd-RNA。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1411】在一些實施態樣中，在第11天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA、IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)之介質中。在一些實施態樣中，在第14天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第17天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，在第21天添加的sd-RNA係添加於包含sd-RNA且視需要包括IL-2、OKT3及APC(包括例如PBMC)中之一或多者之介質中。在一些實施態樣中，sd-RNA靶向PD-1。

【1412】上述實例係經提供以給出如何實施及使用本

發明之組成物、系統及方法的實施態樣的完整揭露及說明給所屬技術領域中具有通常知識者，並非意圖限制發明人對於他們的發明之主張範圍。用於實施本發明之上述模式的修飾為該領域之技藝人士所顯見，且意圖屬於下列權利要求範圍之內。說明書中所提及的所有專利及公開案指示本發明所屬技術領域中具有通常知識者的技能水準。

【1413】所有標題及章節名稱僅用於清晰及參考目的，且不應認為以任何方式限制本發明。舉例而言，所屬技術領域中具有通常知識者應瞭解根據本文所述之本發明之精神及範疇按需要組合來自不同標題及章節之各種態樣的有用性。

【1414】本文所引證之所有參考文獻皆以引用方式且出於所有目的完整併入本文中，猶如個別公開案或專利或專利申請案係特別且個別明示以全文引用方式併入本文中用於所有目的。

【1415】如所屬技術領域中具有通常知識者顯而易見，在不背離本申請案之精神及範疇的情況下可對其進行許多修改及變化。本文所述之特定實施態樣及實例僅以實例方式提供，且本申請案僅由隨附申請專利範圍之用語以及申請專利範圍有權主張之等效物的全部範疇限制。

【序列表】

- <110> 艾歐凡斯生物治療公司
夏提爾科陶德 賽西爾(Chartier-Courtaud, Cecile)
理堤皮海 克里(Ritthipichai, Krit)
- <120> 產生富含腫瘤抗原特異性T細胞的腫瘤浸潤淋巴球(TIL)產物之方法
- <130> 116983-5034
- <150> US 62/614,887
<151> 2018-01-08
- <150> US 62/664,034
<151> 2018-04-27
- <150> US 62/669,319
<151> 2018-05-09
- <150> US 62/697,921
<151> 2018-07-13
- <150> US 62/734,868
<151> 2018-09-21
- <150> US 62/773,715
<151> 2018-11-30
- <160> 126
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 莫羅單抗重鏈
- <400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
180 185 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 2
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 莫羅單抗輕鏈

<400> 2

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 3
<211> 134
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組人IL-2 (rhIL-2)

<400> 3

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 4
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 阿地介白素

<400> 4

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125

Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 5
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重組人IL-4 (rhIL-4)

<400> 5

Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp
 20 25 30

Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg
35 40 45

Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr
50 55 60

Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu
65 70 75 80

Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly
85 90 95

Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn
100 105 110

Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 6
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組人IL-7 (rhIL-7)

<400> 6

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
1 5 10 15

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
20 25 30

Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
35 40 45

Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
50 55 60

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
65 70 75 80

Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
85 90 95

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
100 105 110

Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp

115

120

125

Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
 130 135 140

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

<210> 7
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重組人IL-15 (rhIL-15)

<400> 7

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
 35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 100 105 110

Asn Thr Ser
 115

<210> 8
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重組人IL-21 (rhIL-21)

<400> 8

Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val
 1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro
20 25 30

Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys
35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg
50 55 60

Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr
65 70 75 80

Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp
85 90 95

Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser
100 105 110

Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly
115 120 125

Ser Glu Asp Ser
130

<210> 9
<211> 255
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人4-1BB，腫瘤壞死因子受體超家族成員9
(智人(Homo sapiens))

<400> 9

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 10
<211> 256
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠4-1BB，腫瘤壞死因子受體超家族成員9(家鼠(Mus musculus))

<400> 10

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln
20 25 30

Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
35 40 45

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
50 55 60

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
65 70 75 80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
85 90 95

Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
100 105 110

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
115 120 125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
130 135 140

Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
165 170 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala
180 185 190

Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe
195 200 205

Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln
210 215 220

Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser
225 230 235 240

Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu
245 250 255

<210> 11
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗重鏈

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗輕鏈

<400> 12

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu

85

90

95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗重鏈可變區

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏圖木單抗輕鏈可變區

<400> 14

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
 85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏圖木單抗重鏈CDR1

<400> 15

Ser Thr Tyr Trp Ile Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 烏圖木單抗重鏈CDR2

<400> 16

Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 烏圖木單抗重鏈CDR3

<400> 17

Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 烏圖木單抗輕鏈CDR1

<400> 18

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala His
 1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 烏圖木單抗輕鏈CDR2

<400> 19

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 烏圖木單抗輕鏈CDR3

<400> 20

Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val
 1 5 10

<210> 21
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗重鏈

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 22
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗輕鏈

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Cys Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗可變重鏈

<400> 23

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
 35 40 45
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Pro
 115 120

<210> 24
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗可變輕鏈

<400> 24

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗重鏈CDR1

<400> 25

Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗重鏈CDR2

<400> 26

Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗重鏈CDR3

<400> 27

Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗輕鏈CDR1

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗輕鏈CDR2

<400> 29

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗輕鏈CDR3

<400> 30

Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Pro Ala Leu Thr
1 5 10

<210> 31
<211> 230
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc結構域

<400> 31

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
100 105 110

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
130 135 140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
145 150 155 160

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 165 170 175

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 180 185 190

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 195 200 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 210 215 220

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 32
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 32

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20

<210> 33
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 33

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20

<210> 34
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 34

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
 1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25

<210> 35
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 35

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
 1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25

<210> 36
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 36

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
 1 5 10 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25

<210> 37
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 37

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
 1 5 10 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25

<210> 38
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 38

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
 1 5 10 15

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20

<210> 39

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 39

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 40

Gly Gly Pro Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 1 5 10 15

Cys Pro Ala Pro Glu
 20

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 41

Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His
 1 5 10 15

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25

<210> 42
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Fc結構域**

<400> 42

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Ala Gly Asn Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 20 25 30

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 35 40 45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 50 55 60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 65 70 75 80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 85 90 95

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 100 105 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 115 120 125

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 130 135 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 145 150 155 160

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 165 170 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 180 185 190

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 195 200 205

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 210 215 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
245

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 43

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 44

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 45

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15

<210> 46
<211> 254
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BBL

<400> 46

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
 35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
 50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
 65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
 85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
 100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
 115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
 130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
 145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
 165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
 180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
 195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
 210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
 225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 245 250

<210> 47
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 4-1BBL可溶性結構域

<400> 47

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
1 5 10 15

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
20 25 30

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
35 40 45

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
50 55 60

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
65 70 75 80

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
85 90 95

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
100 105 110

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
115 120 125

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
130 135 140

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
145 150 155 160

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165

<210> 48
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1版本1之可變重鏈

<400> 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 49
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1版本1之可變輕鏈

<400> 49

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 50
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1版本2之可變重鏈

<400> 50

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 51
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1版本2之可變輕鏈

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 52
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> H39E3-2可變重鏈

<400> 52

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Asp Ile Lys Asn Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala
 65 70 75 80

Pro Ser Leu Thr Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Thr
 115 120

<210> 53
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> H39E3-2可變輕鏈

<400> 53

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Gln
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
100 105

<210> 54
<211> 277
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人OX40(智人)

<400> 54

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro

165

170

175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
 210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
 225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
 245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
 260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
 275

<210> 55

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 鼠OX40(家鼯鼠)

<400> 55

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
 20 25 30

Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
 35 40 45

Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
 50 55 60

Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys
 65 70 75 80

Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
 85 90 95

Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg
 100 105 110

Gln Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro
115 120 125

Gly His Phe Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
130 135 140

Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu
145 150 155 160

Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu
165 170 175

Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val
180 185 190

Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
195 200 205

Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
210 215 220

Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
225 230 235 240

Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
245 250 255

Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
260 265 270

<210> 56
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔伏利西單抗(tavolixizumab)重鏈

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 57
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔伏利西單抗輕鏈

<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 58
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔伏利西單抗重鏈可變區

<400> 58

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr
115

<210> 59
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔伏利西單抗輕鏈可變區

<400> 59

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔伏利西單抗重鏈CDR1

<400> 60

Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5

<210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔伏利西單抗重鏈CDR2

<400> 61

Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His
1 5 10

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗重鏈CDR3

<400> 62

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗輕鏈CDR1

<400> 63

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗輕鏈CDR2

<400> 64

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
1 5 10

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗輕鏈CDR3

<400> 65

Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
1 5

<210> 66

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11D4重鍵

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4重鏈可變區

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4輕鏈可變區

<400> 69

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **11D4重鏈CDR1**

<400> 70

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **11D4重鏈CDR2**

<400> 71

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **11D4重鏈CDR3**

<400> 72

Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **11D4輕鏈CDR1**

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **11D4輕鏈CDR2**

<400> 74

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **11D4輕鏈CDR3**

<400> 75

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 76
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **18D8重鏈**

<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 77
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 18D8輕鏈

<400> 77

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 78
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **18D8重鏈可變區**

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **18D8輕鏈可變區**

<400> 79

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 80
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **18D8重鏈CDR1**

<400> 80

Asp Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **18D8重鏈CDR2**

<400> 81

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **18D8重鏈CDR3**

<400> 82

Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 83
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **18D8輕鏈CDR1**

<400> 83

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 84
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **18D8輕鏈CDR2**

<400> 84

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 85
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **18D8輕鏈CDR3**

<400> 85

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 1 5

<210> 86
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu119-122重鏈可變區**

<400> 86

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
 50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 87
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **Hu119-122輕鏈可變區**

<400> 87

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **Hu119-122重鏈CDR1**

<400> 88

Ser His Asp Met Ser
1 5

<210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu119-122重鏈CDR2**

<400> 89

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
 1 5 10 15

Arg

<210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu119-122重鏈CDR3**

<400> 90

His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 91
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu119-122輕鏈CDR1**

<400> 91

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

<210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu119-122輕鏈CDR2**

<400> 92

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> **Hu119-122輕鏈CDR3**

<400> 93

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 94

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> **Hu106-222重鏈可變區**

<400> 94

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 95

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> **Hu106-222輕鏈可變區**

<400> 95

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 96
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu106-222重鏈CDR1**

<400> 96

Asp Tyr Ser Met His
 1 5

<210> 97
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu106-222重鏈CDR2**

<400> 97

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 98
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu106-222重鏈CDR3**

<400> 98

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 99
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu106-222輕鏈CDR1**

<400> 99

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu106-222輕鏈CDR2**

<400> 100

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
 1 5

<210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> **Hu106-222輕鏈CDR3**

<400> 101

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 102
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> OX40L

<400> 102

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
 1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
 20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
 35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
 50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 103
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **OX40L可溶性結構域**

<400> 103

Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu
1 5 10 15

Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu
20 25 30

Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe
35 40 45

Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser
50 55 60

Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val
65 70 75 80

Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys
85 90 95

Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His
100 105 110

Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe
115 120 125

Cys Val Leu
130

<210> 104
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **OX40L可溶性結構域(替代性)**

<400> 104

Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys
1 5 10 15

Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys
20 25 30

Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile
35 40 45

Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr
50 55 60

Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val
65 70 75 80

Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu
85 90 95

Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly
100 105 110

Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
115 120 125

<210> 105
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> **008可變重鏈**

<400> 105

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gln Val His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 106
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 008可變輕鏈

<400> 106

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 107
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 011可變重鏈

<400> 107

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Arg Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 65 70 75 80

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95

Asp Arg Tyr Phe Arg Gln Gln Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 108
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 011可變輕鏈

<400> 108

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 109

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 021可變重鍵

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Arg Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Tyr Ile Thr Leu Pro Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 110

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 021可變輕鍵

<400> 110

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 85 90 95
 Lys Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 100 105

<210> 111
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 023可變重鏈

<400> 111

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Tyr Asp Asn Val Met Gly Leu Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 112
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 023可變輕鏈

<400> 112

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 113
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 113

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro
115 120

<210> 116
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鍵可變區

<400> 116

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 117

<211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化抗體之重鏈可變區

<400> 117

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 118
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化抗體之重鏈可變區

<400> 118

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之輕鏈可變區

<400> 119

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 120
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之輕鏈可變區

<400> 120

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 121

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗體之重鏈可變區

<400> 121

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 122
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化抗體之重鏈可變區

<400> 122

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
 50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 123
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化抗體之輕鏈可變區

<400> 123

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 124

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗體之輕鏈可變區

<400> 124

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 125

<211> 138

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 125

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 126

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鍵可變區

<400> 126

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
100 105 110

201938177

Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125



201938177

【發明摘要】

【中文發明名稱】

產生富含腫瘤抗原特異性 T 細胞的腫瘤浸潤淋巴球
(T I L) 產物之方法

【英文發明名稱】

PROCESSES FOR GENERATING TIL PRODUCTS ENRICHED FOR
TUMOR ANTIGEN-SPECIFIC T-CELLS

【中文】

本發明提供用於重新編程 TIL 以製備具有增加的治療療效之 TIL 治療性族群之經改良及 / 或經縮短的過程及方法。該等經重新編程的 TIL 用於治療性治療方案 (regimen)。

【英文】

The present invention provides improved and/or shortened processes and methods for reprogramming TILs in order to prepare therapeutic populations of TILs with increased therapeutic efficacy. Such reprogrammed TILs find use in therapeutic treatment regimens.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(i)自患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(ii)藉由在包含IL-2及視需要OKT-3之細胞培養基中培養該第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群；

(iii)藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL族群之細胞培養基來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第三TIL族群於數量上高於該第二TIL族群至少100倍，且其中該第二擴增執行至少14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群；及

(iv)使該第二及/或第三TIL族群暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性TIL族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞的數量。

【第2項】

如請求項1之方法，其中該方法進一步包含：

(v)藉由用額外的IL-2、額外的OKT-3及額外的APC補充該第三TIL族群之細胞培養基來在步驟(iv)之前或之後執行額外第二擴增，其中該額外第二擴增執行至少14天以獲得比起步驟(iii)所獲得者較大的治療性TIL族群，其中該

較大的治療性TIL族群展現腫瘤抗原特異性T細胞數量的改變。

【第3項】

一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

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

(d) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二及/或第三TIL族群暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該TF

及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性TIL族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞的數量；

(f) 收集獲自步驟(d)之該治療性TIL族群，其中自步驟(d)轉變至步驟(e)無需打開該系統而發生；及

(g) 將得自步驟(e)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(e)轉移至步驟(f)無需打開該系統而發生。

【第4項】

如請求項3之方法，其進一步包含使用冷凍保存過程將包含步驟(f)之該經收集的TIL族群之該輸注袋冷凍保存的步驟。

【第5項】

如請求項4之方法，其中該冷凍保存過程使用1:1比例的經收集的TIL族群對冷凍保存介質執行。

【第6項】

如請求項4之方法，其中該抗原呈現細胞係周邊血液單核細胞(PBMC)。

【第7項】

如請求項6之方法，其中該PBMC經照射且為同種異體。

【第8項】

如請求項6之方法，其中該PBMC係於步驟(d)之第9至14天中任一天添加至該細胞培養。

【第9項】

如請求項6之方法，其中該抗原呈現細胞係人工抗原呈現細胞。

【第10項】

如請求項3之方法，其中步驟(e)之該收集係使用基於膜之細胞處理系統執行。

【第11項】

如請求項3之方法，其中步驟(e)之該收集係使用LOVO細胞處理系統執行。

【第12項】

如請求項3之方法，其中該多個片段包含約4至約50個片段，其中各片段具有約 27 mm^3 的體積。

【第13項】

如請求項3之方法，其中該多個片段包含約30至約60個片段，其總體積為約 1300 mm^3 至約 1500 mm^3 。

【第14項】

如請求項13之方法，其中該多個片段包含約50個片段，其總體積為約 1350 mm^3 。

【第15項】

如請求項1之方法，其中該多個片段包含約50個片段，其總質量為約1克至約1.5克。

【第16項】

如請求項3之方法，其中該細胞培養基提供於選自由G容器及Xuri細胞袋所組成之群組之容器中。

【第17項】

如請求項3之方法，其中步驟(d)之該細胞培養基進一步包含IL-15及/或IL-21。

【第18項】

如請求項1至17中任一項之方法，其中該IL-2濃度係約10,000 IU/mL至約5,000 IU/mL。

【第19項】

如請求項17之方法，其中該IL-15濃度係約500 IU/mL至約100 IU/mL。

【第20項】

如請求項17之方法，其中該IL-21濃度係約20 IU/mL至約0.5 IU/mL。

【第21項】

如請求項3之方法，其中步驟(f)之該輸注袋係含HypoThermosol之輸注袋。

【第22項】

如請求項5之方法，其中該冷凍保存介質包含二甲亞砜(DMSO)。

【第23項】

如請求項22之方法，其中該冷凍保存介質包含7%至10% DMSO。

【第24項】

如請求項3之方法，其中步驟(c)之該第一期間及步驟(e)之該第二期間各自個別地於一段10天、11天或12天的期

間內執行。

【第25項】

如請求項3之方法，其中步驟(c)之該第一期間及步驟(e)之該第二期間各自個別地於一段11天的期間內執行。

【第26項】

如請求項3之方法，其中步驟(a)至(f)在一段約10天至約22天的期間內執行。

【第27項】

如請求項3之方法，其中步驟(a)至(f)在一段約20天至約22天的期間內執行。

【第28項】

如請求項3之方法，其中步驟(a)至(f)在一段約15天至約20天的期間內執行。

【第29項】

如請求項3之方法，其中步驟(a)至(f)在一段約10天至約20天的期間內執行。

【第30項】

如請求項3之方法，其中步驟(a)至(f)在一段約10天至約15天的期間內執行。

【第31項】

如請求項3之方法，其中步驟(a)至(f)在22天或更少天內執行。

【第32項】

如請求項3之方法，其中步驟(a)至(f)在20天或更少天

內執行。

【第33項】

如請求項3之方法，其中步驟(a)至(f)在15天或更少天內執行。

【第34項】

如請求項3之方法，其中步驟(a)至(f)在10天或更少天內執行。

【第35項】

如請求項5之方法，其中步驟(a)至(f)及冷凍保存在22天或更少天內執行。

【第36項】

如請求項3至35中任一項之方法，其中步驟(e)所收集之該治療性TIL族群包含對治療有效劑量的該TIL而言足夠的TIL。

【第37項】

如請求項36之方法，其中對治療有效劑量而言足夠的TIL數量係約 2.3×10^{10} 至約 13.7×10^{10} 個。

【第38項】

如請求項3至37中任一項之方法，其中步驟(b)至(e)在單一容器中執行，其中在單一容器中執行步驟(b)至(e)相較於在超過一個容器中執行步驟(b)至(e)導致每個經切除之腫瘤(resected tumor)的TIL產率增加。

【第39項】

如請求項3至38中任一項之方法，其中該抗原呈現細

胞係於步驟(d)之該第二期間添加至該 TIL 而無需打開該系統。

【第40項】

如請求項3至39中任一項之方法，其中當投予至個體時，步驟(d)之該第三 TIL 族群提供至少五倍或更多倍的干擾素- γ 產生。

【第41項】

如請求項3至40中任一項之方法，其中微生物汙染之風險相較於開放系統減少。

【第42項】

如請求項3至41中任一項之方法，其中來自步驟(f)或(g)之該 TIL 係輸注至患者。

【第43項】

如請求項3至42中任一項之方法，其中該多個片段包含約4個片段。

【第44項】

一種用於治療癌症個體之方法，該方法包含投予經擴增的腫瘤浸潤淋巴球(TIL)，其包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自個體所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c) 藉由在包含 IL-2 及視需要 OKT-3 之細胞培養基中培養該第一 TIL 族群來執行第一擴增以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容

器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(b)轉變至步驟(c)無需打開該系統而發生；

(d) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二及/或第三TIL族群暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性TIL族群中增加的腫瘤抗原表現及/或增加腫瘤抗原特異性T細胞的數量；

(f) 收集獲自步驟(d)之該治療性TIL族群，其中自步驟(d)轉變至步驟(e)無需打開該系統而發生；及

(g) 將得自步驟(e)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(e)轉移至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(h) 使用冷凍保存過程將包含步驟(f)之該經收集的TIL族群之該輸注袋視需要冷凍保存；及

(i) 投予治療有效劑量的來自步驟(g)之該輸注袋的

該第三 TIL 族群至該患者。

【第 45 項】

一種用於治療癌症個體之經擴增的 TIL 族群，其中該經擴增的 TIL 族群係可藉由方法獲得之第三 TIL 族群，該方法包含：

(a) 藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自個體所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b) 將該腫瘤片段加入密閉系統；

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

(d) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 使該第二及 / 或第三 TIL 族群暴露至轉錄因子 (TF) 及 / 或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子，其中該 TF

及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性 TIL 族群中增加的腫瘤抗原表現及/或增加腫瘤抗原特異性 T 細胞的數量；

(f) 收集獲自步驟 (d) 之該治療性 TIL 族群，其中自步驟 (e) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；及

(g) 將得自步驟 (e) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (f) 轉移至步驟 (g) 無需打開該系統而發生；及

(h) 使用冷凍保存過程將包含步驟 (f) 之該經收集的 TIL 族群之該輸注袋視需要冷凍保存。

【第 46 項】

如請求項 44 或 45 之用於治療癌症個體之 TIL 族群，其中該方法進一步包含一或多個如請求項 1 至 43 中任一項引述之特徵。

【第 47 項】

一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法，該方法包含使 TIL 暴露至轉錄因子 (TF) 及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子以產生治療性 TIL 族群，其中該 TF 及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性 TIL 族群中增加的腫瘤抗原表現及/或增加腫瘤抗原特異性 T 細胞的數量。

【第 48 項】

如請求項 1 至 47 中任一項之方法，其中該蛋白質表現的暫時性改變導致誘導蛋白質表現。

【第49項】

如請求項1至48中任一項之方法，其中該蛋白質表現的暫時性改變導致減少蛋白質表現。

【第50項】

如請求項49之方法，其中採用一或多種sd-RNA以減少暫時性蛋白質表現。

【第51項】

一種用於評估轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子之方法，其中該方法包含擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群、使TIL暴露至轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子以產生治療性TIL族群，其中該TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現的分子提供該治療性TIL族群中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞的數量。

【第52項】

如請求項1至51中任一項之方法，其中該暫時性改變蛋白質表現靶向選自由下列所組成之群組的基因：PD-1、TGFB2、CBLB(CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受體)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1及cAMP蛋白質激酶A(PKA)。

【第53項】

一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(a)藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b)將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c)藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d)添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e)對該第二TIL族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介至少一種短干擾RNA或一種傳訊RNA之轉移；

(f)使該第二TIL族群靜置約1天；

(g)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(f)轉變至步驟(g)無需打開該系統而發生；

(h)收集獲自步驟(g)的該治療性TIL族群以提供經收集的TIL族群，其中自步驟(g)轉變至步驟(h)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(i)將得自步驟(h)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(h)轉移至步驟(i)無需打開該系統而發生；及

(j)使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群，

其中該無菌電穿孔步驟包含遞送用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合所組成之群組的分子表現之短干擾RNA。

【第54項】

一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，該方法包含：

(a)藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b)將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c)藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d)添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該

第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (c) 轉變至步驟 (d) 無需打開該系統而發生；

(e) 對該第二 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟或 SQZ 微流體膜破壞步驟，其中該無菌電穿孔步驟或 SQZ 微流體膜破壞步驟媒介至少一種短干擾 RNA 或一種傳訊 RNA 之轉移；

(f) 使該第二 TIL 族群靜置約 1 天；

(g) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3 抗體、視需要 OX40 抗體及抗原呈現細胞 (APC) 來執行第二擴增以產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 11 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (f) 轉變至步驟 (g) 無需打開該系統而發生；

(h) 收集獲自步驟 (g) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (g) 轉變至步驟 (h) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(i) 將得自步驟 (h) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (h) 轉移至步驟 (i) 無需打開該系統而發生；及

(j) 使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的 TIL 族群，

其中該電穿孔步驟包含遞送用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PKA、CBLB、BAFF(BR3) 及其組合所組成之群組的分子表現之短干擾 RNA，且進一步其中選自由 CCR2、CCR4、

CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合所組成之群組的黏著性分子係藉由 γ 逆轉錄病毒或慢病毒方法插入該第一TIL族群、第二TIL族群或經收集的TIL族群中。

【第55項】

一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(a)藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b)將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c)藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d)添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e)對該第二TIL族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介至少一種短干擾RNA或一種傳訊RNA之轉移；

(f)使該第二TIL族群靜置約1天；

(g)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二

擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(f)轉變至步驟(g)無需打開該系統而發生；

(h)收集獲自步驟(g)的該治療性TIL族群以提供經收集的TIL族群，其中自步驟(g)轉變至步驟(h)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(i)將得自步驟(h)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(h)轉移至步驟(i)無需打開該系統而發生；及

(j)使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群，

其中該無菌電穿孔步驟包含遞送用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB及其組合所組成之群組的分子表現之短干擾RNA。

【第56項】

一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(a)藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b)將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c)藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d)使該第一TIL族群與至少一種sd-RNA接觸，其中該

sd-RNA係以0.1 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、0.5 μM sd-RNA/10,000 個 TIL/100 μL 介質、0.75 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、1 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、1.25 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、1.5 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、2 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質、5 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質或10 μM sd-RNA/10,000個 TIL/100 μL 介質之濃度添加，且其中該 sd-RNA係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及 CBLB及其組合所組成之群組的分子表現；

(e)視需要對該第一 TIL族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA之轉移；

(f)添加 OKT-3以產生第二 TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二 TIL族群，其中該第二 TIL族群於數量上高於該第一 TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(g)使該第二 TIL族群靜置約1天；

(h)藉由對該第二 TIL族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、視需要 OKT-3抗體、視需要 OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三 TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三 TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(c)轉變至步驟(h)無需打開該系統而發生；

(i)收集獲自步驟(h)的該治療性TIL族群以提供經收集的TIL族群，其中自步驟(h)轉變至步驟(i)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(j)將得自步驟(i)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(i)轉移至步驟(j)無需打開該系統而發生；及

(k)使用基於二甲亞砷之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群。

【第57項】

一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(a)藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b)將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c)藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d)使該第一TIL族群與至少一種sd-RNA接觸，其中該sd-RNA係以0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL、1 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、2 μM sd-RNA/10,000個TIL、5 μM sd-RNA/10,000個TIL或10 μM sd-RNA/10,000個TIL之濃度添加，且其中該sd-RNA係用於抑制選自由PD-1、LAG-

3、TIM-3、CISH及CBLB及其組合所組成之群組的分子表現；

(e)視需要對該第一TIL族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種sd-RNA之轉移；

(f)添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(g)使該第二TIL族群靜置約1天；

(h)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(g)轉變至步驟(h)無需打開該系統而發生；

(i)收集獲自步驟(h)的該治療性TIL族群以提供經收集的TIL族群，其中自步驟(h)轉變至步驟(i)無需打開該系統而發生，其中該經收集的TIL族群係治療性TIL族群；

(j)將得自步驟(i)的該經收集的TIL族群轉移至輸液袋，其中自步驟(i)轉移至步驟(j)無需打開該系統而發生；及

(k)使用基於二甲亞碲之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的TIL族群。

【第58項】

一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球(TIL)成治療性TIL族群之方法，其包含：

(a)藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一TIL族群；

(b)將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c)藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d)添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e)使該第二TIL族群靜置約1天；

(f)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(c)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(g)使該第二TIL族群在步驟(d)、(e)及/或(f)之任一者的期間與至少一種sd-RNA接觸，其中該sd-RNA係以0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL/100 μL 介質、0.5 μM sd-

RNA/10,000個 TIL/100 μ L介質、0.75 μ M sd-RNA/10,000個 TIL/100 μ L介質、1 μ M sd-RNA/10,000個 TIL/100 μ L介質、1.25 μ M sd-RNA/10,000個 TIL/100 μ L介質、1.5 μ M sd-RNA/10,000個 TIL/100 μ L介質、2 μ M sd-RNA/10,000個 TIL/100 μ L介質、5 μ M sd-RNA/10,000個 TIL/100 μ L介質或 10 μ M sd-RNA/10,000個 TIL/100 μ L介質之濃度添加，且其中該 sd-RNA 係用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及 CBLB 及其組合所組成之群組的分子表現；

(h)視需要對該第二 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(i)收集獲自步驟 (g) 或 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (g) 轉變至步驟 (i) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(j)將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (i) 轉移至步驟 (j) 無需打開該系統而發生；及

(k)使用基於二甲亞碲之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的 TIL 族群。

【第 59 項】

一種用於擴增腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 成治療性 TIL 族群之方法，其包含：

(a)藉由將獲自患者的腫瘤樣本處理成多個腫瘤片段而自該患者所切除的腫瘤獲得第一 TIL 族群；

(b)將該腫瘤片段加入密閉系統；

(c)藉由在包含IL-2及視需要包含4-1BB促效抗體之細胞培養基中培養該第一TIL族群約2至5天來執行第一擴增；

(d)添加OKT-3以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約1至3天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e)使該第二TIL族群靜置約1天；

(f)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、視需要OKT-3抗體、視需要OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)來執行第二擴增以產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至11天以獲得該第三TIL族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(e)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(g)使該第二TIL族群在步驟(d)、(e)及/或(f)之任一者的期間與至少一種sd-RNA接觸，其中該sd-RNA係以0.1 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、0.75 μM sd-RNA/10,000個TIL、1 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.25 μM sd-RNA/10,000個TIL、1.5 μM sd-RNA/10,000個TIL、2 μM sd-RNA/10,000個TIL、5 μM sd-RNA/10,000個TIL或10 μM sd-RNA/10,000個TIL之濃度添加，且其中該sd-RNA係用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB及其組合所組成之群組的分子表現；

(h)視需要對該第二 TIL 族群執行無菌電穿孔步驟，其中該無菌電穿孔步驟媒介該至少一種 sd-RNA 之轉移；

(i)收集獲自步驟 (g) 或 (h) 的該治療性 TIL 族群以提供經收集的 TIL 族群，其中自步驟 (e) 轉變至步驟 (h) 無需打開該系統而發生，其中該經收集的 TIL 族群係治療性 TIL 族群；

(j)將得自步驟 (i) 的該經收集的 TIL 族群轉移至輸液袋，其中自步驟 (h) 轉移至步驟 (i) 無需打開該系統而發生；及

(k)使用基於二甲亞碲之冷凍保存介質冷凍保存該經收集的 TIL 族群。

【第 60 項】

如請求項 56 至 59 中任一項之方法，其中該 sd-RNA 在該第一擴增期間係以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至該第一細胞族群。

【第 61 項】

如請求項 56 至 59 中任一項之方法，其中該 sd-RNA 在該第一擴增期間係以一天二次、一天一次、每二天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至該第二細胞族群。

【第 62 項】

如請求項 56 至 61 中任一項之方法，其中添加二種 sd-RNA 以用於抑制選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 所組成之群組的二種分子表現。

【第63項】

如請求項56至61中任一項之方法，其中添加二種sd-RNA以用於抑制二種分子表現，其中該二種分子係選自由下列所組成之群組：

- i. PD-1及LAG-3，
- ii. PD-1及TIM-3，
- iii. PD-1及CISH，
- iv. PD-1及CBLB，
- v. LAG-3及TIM-3，
- vi. LAG-3及CISH，
- vii. LAG-3及CBLB，
- viii. TIM-3及CISH，
- ix. TIM-3及CBLB，及
- x. CISH及CBLB。

【第64項】

如請求項56至62中任一項之方法，其中添加超過二種sd-RNA以用於抑制選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB所組成之群組的超過二種分子表現。

【第65項】

如請求項56至64中任一項之方法，其中選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB所組成之群組的至少一種分子之表現在與該至少一種sd-RNA接觸的該TIL中係減少至少80%、85%、90%或95%。

【第66項】

如請求項 56 至 64 中任一項之方法，其中選自由 PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH 及 CBLB 所組成之群組的至少一種分子之表現在與該至少一種 sd-RNA 接觸的該 TIL 中係減少至少 80%、85%、90% 或 95% 達至少 12 小時、至少 24 小時或至少 48 小時。

【第 67 項】

如請求項 56 至 64 中任一項之方法，其中該 sd-RNA 係藉由方法製備，該方法包含自藉由聚合酶鏈反應 (PCR) 所獲得且適用於體外 (*in vitro*) 轉錄 sd-RNA 之線性雙股 DNA 模板執行體外轉錄，該線性雙股 DNA 模板自 5' 至 3' 包含：在該雙股 DNA 之編碼股上之 RNA 聚合酶啟動子；長度小於 3,000 個核苷酸且在轉染至真核細胞後用於將 mRNA 有效轉譯成可偵測多肽之 5' 非轉譯區；編碼該多肽之開放閱讀框，其中該多肽對於待轉染之細胞是異源性的且其中該多肽係選自由免疫細胞之配體或受體、刺激或抑制免疫系統功能之多肽及抑制致癌多肽之功能的多肽所組成之群組；在轉染至真核細胞後用於將 mRNA 有效轉譯成可偵測多肽之 3' 非轉譯區；及在該雙股 DNA 之編碼股上之 50 至 5,000 個核苷酸的聚 (A) 延伸，其中該啟動子對於該開放閱讀框是異源性的，且其中該 DNA 模板並不包含在 DNA 載體內且終止於該聚 (A) 延伸的 3' 端。

【第 68 項】

如請求項 67 之方法，其中該 RNA 聚合酶啟動子包含選自由 T7、T3 或 SP6 RNA 聚合酶所組成之群組的 RNA 聚合酶

之一致結合序列。

【第69項】

如請求項67之方法，其中該開放閱讀框編碼選自由PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB所組成之群組的多肽。

【第70項】

如請求項67之方法，其中該線性雙股DNA模板進一步包含內部核糖體進入位點。

