表达膜结合细胞因子的肿瘤浸润淋巴细胞

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体地涉及一种表达膜结合细胞因子的肿瘤浸润淋巴细胞及其制备方法。

背景技术

肿瘤浸润淋巴细胞（tumor infiltrating lymphocyte, TIL）疗法是一种新兴的免疫细胞疗法，针对实体瘤已初步展现出较为优异的疗效。在肿瘤内存在的 TIL 是一个高度异质性的群体，受肿瘤微环境的免疫抑制，杀伤肿瘤效果有限，体内存续时长有限。目前的 TIL 疗法包括在体外从患者实体瘤组织中培养获得重新激活和扩大的 TIL 细胞群，再回输到患者体内，以实现靶向实体肿瘤杀伤效果的提升。但肿瘤内部的免疫抑制性微环境对回输的 TIL 仍存在抑制作用，回输 TIL 在体内的活性与存续时间都仍然有待提高。

通过外源基因对待回输的未经修饰的天然 TIL 进行修饰是解决上述问题的手段之一，但目前本领域内基因修饰的 TIL 种类不多，亟需更多能提升 TIL 增殖能力、肿瘤杀伤效力并同时延长其体内存续时间的修饰技术。

发明内容

本发明第一方面首先提供一种修饰的 TIL，其表达膜锚定细胞因子，所述细胞因子为膜锚定 IL-7。

在一个或多个实施方案中，所述膜锚定 IL-7 包括 IL-7 或其功能片段和跨膜区。优选地，IL-7 或其功能片段位于跨膜区的 N 端方向。

在一个或多个实施方案中，所述 IL-7 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示；其示例性编码序列如 SEQ ID NO:8 所示。

在一个或多个实施方案中，所述跨膜区为蛋白跨膜结构域。优选地，所述蛋白跨膜结构域包括选自 CD8 跨膜区、CD28 跨膜区和 IL-7Rα 跨膜区中的任一种。优选地，CD8 跨膜区 SEQ ID NO:3 所示，其示例性编码序列如 SEQ ID NO:4 所示。

在一个或多个实施方案中，所述跨膜区为 GPI 锚定区。优选地，所述 GPI 锚定区包括选自以下的一种或多种 GPI 膜锚定蛋白的膜锚定区：CD44、CD56、CD73、CD55、Thy1、AchE、IAP、ALPP、CD59、CD14、CD16、CD24、CD28、CD48、CD52、CD58、CD66a、CD66c、CD66d、CD66e、CD67、CD87、CD108、CD157、uPAR、JMH 蛋白、GDNFR、CNTFR、TAG-1、PrP、磷脂酰肌醇蛋白、信号素 7、CEA、GFR、Ly6G、转铁蛋白受体、接触素（F3）和 T-钙黏蛋白。更优选地，所述 GPI 锚定区选自以下的一种或多种 GPI 膜锚定蛋白的膜锚定区：CD52、CD48、CD55、ALPP、CD90。

在一个或多个实施方案中，所述膜锚定 IL-7 还包括膜表面标签。优选地，所述膜表面标签位于 IL-7 和跨膜区之间。优选地，所述膜锚定 IL-7 从 N 端到 C 端依次包括 IL-7、膜表面标签和跨膜区。

在一个或多个实施方案中，所述膜表面标签包括 B 细胞表面抗原的胞外结构域或其保留有与抗体结合功能的变体。优选地，B 细胞表面抗原是 BCMA，所述膜表面标签为 BCMA 胞外区或其保留有与抗 BCMA 抗体结合功能的变体。优选地，所述变体为截短变体、插入变体、缺失变体、取代变体或其组合。

在一个或多个实施方案中，所述 BCMA 胞外区如 SEQ ID NO:21 所示。

在一个或多个实施方案中，所述 BCMA 胞外区变体是截短变体，例如 SEQ ID NO:23 所示。

在一个或多个实施方案中，所述 BCMA 胞外区变体是截短的取代变体，例如 SEQ ID NO:25 所示。

在一个或多个实施方案中，所述膜锚定 IL-7 还包括位于 IL-7 和所述膜表面标签之间的接头。在一个或多个实施方案中，所述接头为刚性接头或软性接头，优选为刚性接头。优选地，所述刚性接头的序列为选自 SEQ ID NO:9、11、15、17 中的任一种。

在一个或多个实施方案中，所述膜锚定 IL-7 还包括位于所述跨膜区 N 端（例如所述膜表面标签和跨膜区之间）的铰链区或接头。铰链区包括但不限于：CD4 胞外铰链区、CD8 胞外铰链区、CD28 胞外铰链区、IgG1Fc 铰链区和 IgG4Fc 铰链区。优选地，所述铰链区为 CD8 胞外铰链区。优选地，所述 CD8 胞外铰链区的序列如 SEQ ID NO:19 所示。接头为刚性接头或软性接头，优选为刚性接头。优选地，所述刚性接头的序列为选自 SEQ ID NO:9、11、15、17 中的任一种。

优选地，所述接头位于 IL-7 和所述膜表面标签之间和/或位于所述膜表面标签和跨膜区之间。

在一个或多个实施方案中，所述膜锚定 IL-7 还包括信号肽。所述信号肽位于所述膜锚定 IL-7 的 N 端。优选地，所述信号肽为 CD52 信号肽或 IL-7 信号肽。优选地，所述 CD52 信号肽如 SEQ ID NO:1 所示；其示例性编码序列如 SEQ ID NO:2 所示。优选地，所述 IL-7 信号肽如 SEQ ID NO:5 所示；其示例性编码序列如 SEQ ID NO:6 所示。

在一个或多个实施方案中，所述膜锚定 IL-7 包含依次连接的：任选的信号肽、IL-7、任选的接头、BCMA 胞外区或其变体、任选的铰链区或接头、和跨膜区，所述信号肽是 CD52 信号肽或 IL-7 信号肽，所述跨膜区是 CD8 跨膜区或 CD52。

在一个或多个实施方案中，所述膜锚定 IL-7 包含依次连接的：信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和跨膜区。

在一个或多个实施方案中，所述膜锚定 IL-7 包含依次连接的：

CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，

CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD52，

CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，

CD52 信号肽、IL-7、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，

IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，

IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD52。

在一个或多个实施方案中，所述膜锚定 IL-7 的氨基酸序列为选自 SEQ ID NO:31、33、35、37、39、41、43、45 和 47 中的任一种或几种。

在一个或多个实施方案中，所述膜锚定 IL-7 的编码核酸序列为上述 SEQ ID NO:31、33、35、37、39、41、43、45 和 47 的编码核酸序列中的任一种或几种。优选地，所述膜锚定 IL-7 的编码核酸序列为选自 SEQ ID NO:32、34、36、38、40、42、44 和 46 和 48 中的任一种或几种。

在第一方面的第一组实施方案中，所述 TIL 通过以下方法制备：用 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得 TIL 细胞群。

在一个或多个实施方案中，所述样品选自：腹水、手术切除原发灶样本、同时性和异时性手术切除转移灶样本、穿刺样本和体液。

在一个或多个实施方案中，所述样品是含肿瘤细胞的组织。优选地，所述含肿瘤细胞的组织经过预处理，包括碎片化和/或解离肿瘤组织。所述肿瘤细胞来源于选自下组的肿瘤：黑色素瘤、胶质瘤、甲状腺肿瘤、胃癌、肺癌、胃肠道间质瘤、肠癌、肝癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜间质肉瘤、盆腔低分化腺癌、胆囊癌、胆管癌、头颈癌、结直肠癌、脑胶质瘤、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、肾癌和骨肉瘤。优选地，所述含肿瘤细胞的组织是癌症对象的肿瘤组织或体液。

在一个或多个实施方案中，所述体液包括血液、胸积液、组织液、淋巴液和/或腹水。

在一个或多个实施方案中，所述种子细胞培养基包括以下的组分：细胞培养成分、细胞因子和免疫检查点抗体或其抗原结合片段，其中所述细胞因子包括 IL-2，所述免疫检查点包括：PD-1、LAG-3、TIGIT 和/或 CTLA-4，所述细胞培养成分为血清培养基或无血清培养基。

在一个或多个实施方案中，所述 TIL 种子细胞培养基包括以下组分的组合中的任一种：1）IL-2、IL-6、IL-21、IFN-γ、TIGIT 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；2）IL-2、IL-4、IL-10、IL-21、CD137 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；3）IL-2、IL-7、IL-12、IL-21、CD137 抗体、CD28 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；4）IL-1β、IL-2、IL-7、G-CSF、GM-CSF、IFN-γ、LAG3 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；5）IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、M-CSF、IFN-β、IFN-γ、TIGIT 抗体、CTLA-4 抗体和基础培养基；6）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、CD137 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；7）IL-2、IL-4、IL-10、IL-15、G-CSF、M-CSF、CD28 抗体、OX-40 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；8）IL-2、IL-7、IL-15、IFN-γ、CD137 抗体、CD40 抗体、OX-40 抗体、TIGIT 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；9）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、IFN-γ、CD137 抗体、CD28 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；10）IL-2、IL-7、IL-12、G-CSF、GM-CSF、IFN-α、IFN-γ、CD28 抗体、CD40 抗体、TIGIT 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；11）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、PD-1 抗体、RRx-001、CAL-101 和基础培养基；12）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、M-CSF、PD-1 抗体、CNI-1493 和基础培养基；13）IL-2、IL-7、IL-15、CD137 抗体、CD28 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、达沙替尼和基础培养基；14）IL-2、IL-6、IL-12、G-CSF、M-CSF、IFN-β、IFN-γ、CTLA-4 抗

体、PD-1 抗体、达沙替尼、LYC-55716、GENE-1858 和基础培养基；15）IL-1α、IL-2、IL-9、IL-15、GM-CSF、CD137 抗体、CD28 抗体、LAG3 抗体、TIGIT 抗体、CNI-1493 和基础培养基；16）IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、G-CSF、M-CSF、IFN-γ、CD28 抗体、CD40 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、CNI-1493、达沙替尼、GNE-1858 和基础培养基。优选地，上述组分的组合中还包括血清和/或抗生素。

在第一方面的第二组实施方案中，所述 TIL 通过以下方法制备：（1）用 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得第一 TIL 细胞群，和（2）用 TIL 细胞扩增培养基孵育第一 TIL 细胞群，获得第二 TIL 细胞群。

在一个或多个实施方案中，所述样品选自：腹水、手术切除原发灶样本、同时性和异时性手术切除转移灶样本、穿刺样本和体液。

在一个或多个实施方案中，所述样品是含肿瘤细胞的组织。优选地，所述含肿瘤细胞的组织经过预处理，包括碎片化和/或解离肿瘤组织。所述肿瘤细胞来源于选自下组的肿瘤：黑色素瘤、胶质瘤、甲状腺肿瘤、胃癌、肺癌、胃肠道间质瘤、肠癌、肝癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜间质肉瘤、盆腔低分化腺癌、胆囊癌、胆管癌、头颈癌、结直肠癌、脑胶质瘤、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、肾癌和骨肉瘤。优选地，所述含肿瘤细胞的组织是癌症对象的肿瘤组织或体液。

在一个或多个实施方案中，所述体液包括血液、胸积液、组织液、淋巴液和/或腹水。

在一个或多个实施方案中，步骤（1）中所述 TIL 种子细胞培养基包括以下组分的组合中的任一种：1）IL-2、IL-6、IL-21、IFN-γ、TIGIT 抗体、PD-1 抗体、TNF-α 和基础培养基；2）IL-2、IL-4、IL-10、IL-21、CD137 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、TNF-α 和基础培养基；3）IL-2、IL-7、IL-12、IL-21、CD137 抗体、CD28 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；4）IL-1β、IL-2、IL-7、G-CSF、GM-CSF、IFN-γ、LAG3 抗体、PD-1 抗体、TNF-α 和基础培养基；5）IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、M-CSF、IFN-β、IFN-γ、TIGIT 抗体、CTLA-4 抗体和基础培养基；6）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、CD137 抗体、PD-1 抗体、TNF-α 和基础培养基；7）IL-2、IL-4、IL-10、IL-15、G-CSF、M-CSF、CD28 抗体、OX-40 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；8）IL-2、IL-7、IL-15、IFN-γ、CD137 抗体、CD40 抗体、OX-40 抗体、TIGIT 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；9）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、IFN-γ、CD137 抗体、CD28

抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；10）IL-2、IL-7、IL-12、G-CSF、GM-CSF、IFN-α、IFN-γ、CD28 抗体、CD40 抗体、TIGIT 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；11）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、PD-1 抗体、RRx-001、CAL-101 和基础培养基；12）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、M-CSF、PD-1 抗体、CNI-1493 和基础培养基；13）IL-2、IL-7、IL-15、CD137 抗体、CD28 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、达沙替尼和基础培养基；14）IL-2、IL-6、IL-12、G-CSF、M-CSF、IFN-β、IFN-γ、CTLA-4 抗体、PD-1 抗体、达沙替尼、LYC-55716、GENE-1858 和基础培养基；15）IL-1α、IL-2、IL-9、IL-15、GM-CSF、CD137 抗体、CD28 抗体、LAG3 抗体、TIGIT 抗体、CNI-1493 和基础培养基；16）IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、G-CSF、M-CSF、IFN-γ、CD28 抗体、CD40 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、CNI-1493、达沙替尼、GNE-1858 和基础培养基。优选地，上述组分的组合中还包括血清和/或抗生素。

在一个或多个实施方案中，步骤（2）中的 TIL 细胞扩增培养基包含 IL-2、IL-7、IL-15 和免疫检查点抗体或其抗原结合片段，优选地，所述免疫检查点抗体包括 PD-1 抗体。

在一个或多个实施方案中，TIL 细胞扩增培养基还包括血小板或血小板。所述血小板为异体血小板或对象自体血小板。

在一个或多个实施方案中，步骤（2）中的 TIL 细胞扩增培养基包含以下组分的组合中的任一种：17）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体和 GM-CSF；18）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体和 GITR 抗体；19）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、CD3 抗体和 CD28 抗体，优选地，所述 CD3 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；20）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体和 GM-CSF，优选地，所述 CD3 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；21）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体和 CD137 抗体，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；22）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、GITR 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、TWS119 和 CD137 抗体，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；23）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、TIGIT 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体和 GM-CSF，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；24）IL-2、IL-7、IL-15、LAG3 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体和

GITR 抗体，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；25）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、TIGIT 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体、CD40 抗体、OX-40 抗体和自体血小板，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；26）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、CTLA-4 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体、GITR 抗体、GM-CSF、TWS119 和异体血小板，优选地，所述 CD3 抗体和 CD28 抗体与基质偶联。

在一个或多个实施方案中，所述 TIL 细胞扩增培养基还包括血清和/或血小板，以及基础培养基。

在一个或多个实施方案中，种子细胞培养基和扩增培养基中的基础培养基选自 AIM-V、X-VIVO、DMEM、RPMI1640、OpTmizerTM 和 FUJIFILM Irvin MHM-C 中的任一种或几种。

在一个或多个实施方案中，所述血清选自人 AB 血清、对象自体血清或动物源血清。

本发明还提供本文任一实施方案所述的修饰的 TIL 的制备方法，包括向 TIL 中导入所述膜锚定 IL-7 的编码核酸序列。

在一个或多个实施方案中，导入前，所述 TIL 不表达所述膜锚定 IL-7。

在一个或多个实施方案中，不表达所述膜锚定 IL-7 的 TIL 为未经修饰的 TIL。

在一个或多个实施方案中，所述未经修饰的 TIL 由本发明第一方面的第一组或第二组实施方案中任一项所记载的制备 TIL 的方法所制备。

在一个或多个实施方案中，所述方法包括：向 TIL 中导入表达所述膜锚定 IL-7 的核酸构建物，例如表达载体或 mRNA。优选地，所述表达载体为病毒载体或非病毒载体。优选地，所述表达载体为整合型载体或非整合型载体。优选地，所述病毒载体为慢病毒载体。

在一个或多个实施方案中，所述非病毒载体为基于转座子体系的载体。优选地，所述非病毒载体为基于 PiggyBac 转座系统或 Sleeping Beauty 转座系统的载体。优选地，所述非病毒载体为 pKB20 或 pNB328 载体。

在一个或多个实施方案中，所述表达载体包含本发明第一方面任一实施方案中所记载的膜锚定 IL-7 的编码核酸序列。优选地，所述表达载体为包含本发明第一方

面任一实施方案中所记载的膜锚定 IL-7 的编码核酸序列的 pKB20 表达载体。

在一个或多个实施方案中，所述方法包括通过电转或脂质体纳米颗粒（LNP）将所述核酸构建物导入到未经修饰的 TIL。

在一个或多个实施方案中，所述方法包括：1）用本发明第一方面的第二组实施方案中任一项所记载的 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得第一 TIL 细胞群；2）通过电转或脂质体纳米颗粒将所述表达膜锚定 IL-7 的核酸构建物导入所述第一 TIL 细胞群，获得第二 TIL 细胞群；和 3）用本发明第一方面的第二组实施方案中任一项所记载的 TIL 细胞扩增培养基孵育所述第二 TIL 细胞群，获得第三 TIL 细胞群。所述方法的其他特征如本发明第一方面的第二组实施方案中任一项所记载。

本发明还提供由本文任一实施方案所述的修饰的 TIL 的制备方法制备得到的修饰的 TIL。

本发明还提供本文任一实施方案所述的修饰的 TIL 在制备预防或治疗肿瘤的药物中的用途。

本发明还提供一种预防或治疗肿瘤的方法，包括向有需要的对象施用本文任一实施方案所述的修饰的 TIL。

在一个或多个实施方案中，所述肿瘤选自以下的一种或多种：黑色素瘤、胶质瘤、甲状腺肿瘤、胃癌、肺癌、胃肠道间质瘤、肠癌、肝癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜间质肉瘤、盆腔低分化腺癌、胆囊癌、胆管癌、头颈癌、结直肠癌、脑胶质瘤、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、肾癌和骨肉瘤。

本发明还提供一种多肽，包含依次连接的：任选的信号肽、IL-7、任选的接头、BCMA 胞外区或其变体、任选的铰链区或接头、和跨膜区，所述信号肽是 CD52 信号肽或 IL-7 信号肽，所述跨膜区是 CD8 跨膜区或 CD52。

在一个或多个实施方案中，所述多肽包含依次连接的：

CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，

CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，

CD52 信号肽、IL-7、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，

IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，

IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD52。

本发明优点：

本发明通过 GPI 锚定蛋白将细胞因子 IL-7 锚定在 TIL 表面，能够有效地激活和增殖 TIL，显著提升其肿瘤杀伤的效应功能，并且与通过常规的氨基酸跨膜结构域固定相比，通过 GPI 锚定的膜表面 IL-7 表达强度有了显著提升。同时本发明在膜锚定 IL-7 的结构中引入 BCMA 这一在 T 细胞表面不存在的小分子量蛋白的野生型或突变体序列作为检测和分选标签，除了有效实现检测和分选膜锚定 IL-7 表达阳性的 TIL 外，在抗体存在的条件下在体内还能够有效介导 ADCC 和 CDC 效应，及时杀伤含有 BCMA 胞外区的表达膜锚定 IL-7 的 TIL，发挥分子刹车的作用，大大提升了表达膜锚定 IL-7 TIL 的临床应用安全性。

附图说明

图 1、T002-TIL 与 T002-2 细胞对同源黑色素瘤细胞 RTCA 杀伤曲线；

图 2、T014-9 细胞对 SKOV-3 320 CDX 小鼠模型体内杀伤的肿瘤体积变化曲线；

图 3、T014-9 细胞对 SKOV-3 320 CDX 小鼠模型体内杀伤的荧光活体成像结果；

图 4、T011-TIL 与 T011-9 细胞对同源 PDX 小鼠模型体内杀伤的肿瘤体积变化曲线；

图 5、T011 患者 TIL 回输治疗前后肿瘤病灶影像学评估结果；

图 6、T012 患者 TIL 回输治疗前后肿瘤病灶影像学评估结果；

图 7、T013 患者 TIL 回输治疗前后肿瘤病灶影像学评估结果；

图 8、T014 患者 TIL 回输治疗前后肿瘤病灶影像学评估结果。

具体实施方式

发明人发现，通过将细胞因子 IL-7 和 BCMA 的部分锚定在 TIL 表面，能够有效地激活和增殖 TIL、实现检测和分选膜锚定 IL-7 表达阳性的 TIL、并能有效介导分子刹车作用。

术语定义

在本申请中，术语“干扰素”通常是指抑制病毒复制和细胞增殖并调节免疫应答的具有高度种特异性的蛋白家族。典型的合适的干扰素包括但不限于：重组干扰素α-2b，重组干扰素α-2a，重组干扰素α-2C，干扰素α-n1，共有α干扰素，或干扰素α-n3。

在本申请中，术语“集落刺激因子”通常是指一类分泌型的糖蛋白，其与造血干细胞表面上的受体蛋白结合，从而激活细胞内信号传导途径，其可导致细胞增殖并分化成特定类型的血细胞（通常是白细胞，对于红细胞形成，参见促红细胞生成素）。它们可以人工合成并外源性施用。

在本申请中，术语“抗原结合片段”通常是指抗体分子的一部分，其包含负责抗体与抗原之间的特异性结合的氨基酸。抗原中由抗体特异性地识别和结合的部分是称作如上文所述的“表位”。如上文所述，抗原结合结构域可典型地包含抗体轻链可变区（VL）和抗体重链可变区（VH）；然而，其并非必须包含两者。Fd片段例如具有两个VH区并且通常保留完整抗原结合结构域的一些抗原结合功能。抗体的抗原结合片段的实例包括（1）Fab片段，具有VL、VH、恒定轻链（CL）和CH1结构域的单价片段；（2）F（ab’）2片段，具有由铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；（3）具有两个VH和CH1结构域的Fd片段；（4）具有抗体单臂的VL和VH结构域的Fv片段，（5）dAb片段（Ward等人, “Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From Escherichia coli, ” Nature 341:544-546（1989），其以引用的方式整体并入本文），其具有VH结构域；（6）分离的互补决定区（CDR），和（7）单链Fv（scFv），例如源于scFV-文库。尽管Fv片段的两个结构域VL和VH是由独立基因编码，但其可通过合成连接子使用重组方法接合，合成连接子使得其被制备为其中VL和VH区配对以形成单价分子的单一蛋白链（称为单链Fv（scFv））（可参见例如Huston等人, “Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in Escherichia coli, ”Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883（1988））。这些抗体片段使用所属领域的技术人员已知的常规技术获得，且以与完整抗体相同的方式评估所述片段的功能。本申请中，术语“抗原结合片段”还包括与抗原，特别是细胞表面受体分子抗原特异性结合的配体。配体通常是可以以高亲和力及特异性方式与受体蛋白（例如所述抗原）结合以引发功能反应的多肽或化合物。例如，所述配体

可以包括 CD40 的配体 CD40L，CD137 的配体 CD137L，CD28 的配体 CD80 和/或 OX-40 的配体 OX-40L。

在本申请中，术语“免疫检查点”通常是指 CD4+和 CD8+T 细胞的细胞表面上的一组分子。这些分子可以有效地用作下调调节或抑制抗肿瘤免疫应答的“制动器”。可以通过抑制 DNA、RNA 或蛋白质水平来抑制这些抑制性分子。

在本申请中，术语“激活型抗体”通常是指针对免疫细胞如 T 细胞表面受体如 TCR 和/或共刺激受体的抗体，这些抗体通过与 TCR 和/或共刺激受体相结合，能够开启这些受体下游的激活信号通路，使所述免疫细胞的活化和增殖水平显著提升。

在本申请中，术语“共刺激受体”通常是指在免疫细胞，如 T 细胞表面表达的激活免疫应答反应所依赖的一类受体。共刺激受体在抗原呈递细胞存在且已提供第一信号的前提下，通过与其相应的激活型抗体、配体或抗原结合片段相结合后打开共刺激信号，进而完全激活免疫效应细胞。共刺激受体介导的信号通路的激活通常对于免疫应答的有效发生起着关键作用。常见的共刺激受体包括但不限于 CD28、CD40、CD137 和 OX-40。

在本申请中，术语“肿瘤坏死因子 TNF”通常是指 TNF 蛋白，并且不是 TNF 配体的超家族。人 TNFα 的 Genbank 登录号为 NP_000585.2。术语“TNFα”涵盖 TNFα 的前体形式、前 TNFα（pro-TNFα）、全长 TNFα、以及由细胞内过程产生的任何形式的 TNFα。该术语还涵盖 TNFα 的天然存在的和非天然存在的变体，例如剪接变体、等位基因变体、和同种型。TNFα 能结合两个受体，TNFR1（1 型 TNF 受体；CD120a；p55/60）和 TNFR2（2 型 TNF 受体；CD120b；p75/80）。TNFα 起促炎性细胞因子的作用，例如在神经炎症中起作用。

在本申请中，术语“肿瘤浸润淋巴细胞”通常是指从肿瘤组织中分离出的浸润淋巴细胞。免疫组织化学染色显示，肿瘤浸润淋巴细胞可以包括 CD3+ T 细胞、CD20+、CD79α+B 细胞、浆细胞和 CD56+NK 细胞；也可以包括 T 细胞、少量的 B 细胞、NK 细胞、巨噬细胞和树突状细胞。所述肿瘤浸润淋巴细胞可以通过直接的细胞毒性 T 淋巴细胞和分泌细胞因子产生高效、特异性强的抗肿瘤杀伤效应。在本申请中，所述肿瘤浸润淋巴细胞可以包括单核白血球细胞，所述单核白血球细胞离开血流并迁移至一肿瘤。所述肿瘤浸润淋巴细胞可以为选自于由 T 细胞、B 细胞、自然杀手细胞、自然杀手 T 细胞所组成的群组。

在本申请中，术语“种子细胞”通常是指使用包括本申请的培养基在内的任何合适的培养基从肿瘤组织中培养出来的肿瘤浸润淋巴细胞。这些细胞即可以作为后续进一步扩大培养的起始细胞群，也可以作为终端用途的细胞群，比如用于对受试者个体进行回输治疗的细胞群。所述种子细胞可以从肿瘤组织中经过任何不同的培养时长获得，所述种子细胞的培养时长可以根据所述种子细胞的后续用途来确定，而不局限于特定的培养时长。

在本申请中，术语“IL-15”通常是指充当T细胞（特别是肠上皮内淋巴细胞（IEL））和自然杀伤（NK）细胞的有效生长、存活和活化因子的促炎细胞因子，也可称为“IL-15抗原”和“白细胞介素15”。已在多种炎性疾患，包括CD、类风湿性关节炎（RA）和牛皮癣中证实了IL-15的表达增加（Malamut等人，2010）。IL-15被认为是CD免疫病理的中心调控因子和RCD中淋巴瘤形成的非冗余驱动因子。

在本申请中，术语“IL-2”通常是指从正常外周血淋巴细胞产生并以低浓度存在于体内的淋巴因子衍生出的蛋白质。最初，Morgan等（1976）Science193：1007-1008描述了IL-2，起初称为T细胞生长因子，因为它能够诱导刺激的T淋巴细胞增殖。该术语也包括IL-2的表达后修饰的蛋白质，例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。

在本申请中，术语“IL-7”通常是指一种由IL-7基因编码的蛋白质。IL-7是骨髓和胸腺中的基质细胞分泌的造血生长因子。它可以由角质形成细胞，树突状细胞，肝细胞，神经元和上皮细胞产生。IL-7可以涉及对T细胞和B细胞的作用。

在本申请中，术语“PD-1”通常是指属于CD28家族的免疫抑制性受体。PD-1主要在之前活化的T细胞上体内表达，并结合两种配体，PD-1和PD-2。完整hPD-1序列可见于GenBank登录号U64863。

在本申请中，术语“LYC-55716”通常是指一种RORγ激活剂。其CAS编号为2055536-64-4。

在本申请中，术语“GNE-1858”通常是指一种HPK1抑制剂，其CAS编号为T11438。

在本申请中，术语“TWS119”通常是指一种GSK-3抑制剂，其CAS编号为601514-19-6。

在本申请中，术语“RRX-001”通常是指一种具有放射增敏活性的表观遗传调节剂。所述RRX-001可下调CD47 /SIRPα轴并使肿瘤微环境中的TAM和其他免疫抑

制细胞重新极化为免疫刺激表型。其 CAS 编号为 925206-65-1。

在本申请中，术语“CNI-1493”通常是指一种可以阻止炎性细胞因子（包括 TNF）产生的化合物，其 CAS 编号为 164301-51-3。

在本申请中，术语“锚定”指通过分子间的相互作用（化学键、范德华力及氢键）将感兴趣的部分固定在物质上。膜锚定细胞因子指固定在细胞膜上的细胞因子。

本文中，术语“诱导 TIL”是指从动物肿瘤中分离出 TIL 细胞的过程。将 TIL 细胞体外扩增到一定数量后，可以输回到动物体内，达到控制肿瘤生长、转移的效果。

本发明适合从任何肿瘤组织中分离 TIL，包括开放性手术或微创手术获得的肿瘤组织。示例性肿瘤组织例如胃癌、甲状腺肿瘤、胆囊癌、胆管癌、肺癌、黑色素瘤、头颈癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肝癌、结直肠癌、脑胶质瘤、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、肾癌、骨肉瘤等癌症的肿瘤组织。

发明详述

本发明首先提供一种修饰的 TIL，其表达膜锚定 IL-7。膜锚定 IL-7 是一种包括一个或多个 IL-7 或其功能片段和跨膜区的多肽，任选还包括膜表面标签。IL-7 的序列如 SEQ ID NO:7 所示。IL-7 的功能片段具有本领域的通常含义，本领域技术人员知晓其序列。

虽然发明人发现 GPI 锚定的膜表面 IL-7 表达强度的显著提升，但使用常规蛋白跨膜结构域也可以实现一定的效果。所述跨膜区可以为所述膜表面标签的跨膜区，也可以为其他跨膜蛋白的跨膜区，只要其能够将所述膜锚定 IL-7 铆定在细胞膜表面，并对其活性和功能不产生负面影响即可。因此，本领域技术人员可以根据需要（例如根据膜的结构或组成）选择合适的跨膜区。跨膜区包括但不限于 CD28、CD8、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、LCK、ICOS、DAP10、siglec-9、siglec-10、siglec-15、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、IL-2Rβ、IL-2Rγ、IL-4Rα、IL-7Rα、IL-10R、IL-12R、IL-15R、IL-21R、CD27 和 CD40 中任一种的跨膜区。示例性跨膜区包括 CD28 跨膜区、CD8 跨膜区、IL-7R 跨膜区。跨膜区与其相邻结构（例如膜表面标签）通过铰链区或接头连接。因此，所述多肽可以是膜表面蛋白或跨膜蛋白。

当然，优选跨膜区为 GPI 锚定区，可以包括选自以下的一种或多种 GPI 膜锚定蛋白的膜锚定区：CD44、CD56、CD73、CD55、Thy1、AchE、IAP、ALPP、CD59、

CD14、CD16、CD24、CD28、CD48、CD52、CD58、CD66a、CD66c、CD66d、CD66e、CD67、CD87、CD108、CD157、uPAR、JMH 蛋白、GDNFR、CNTFR、TAG-1、PrP、磷脂酰肌醇蛋白、信号素 7、CEA、GFR、Ly6G、转铁蛋白受体、接触素（F3）和 T-钙黏蛋白。优选地，所述 GPI 锚定区选自以下的一种或多种 GPI 膜锚定蛋白的膜锚定区：CD52、CD48、CD55、ALPP、CD90。CD52 的 GPI 锚定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:29 所示，其示例性编码序列如 SEQ ID NO:30 所示。

所述膜表面标签位于所述 IL-7 的 N 段或者 C 端。因此，所述膜表面细胞因子可以具有：膜表面标签-IL-7-跨膜区，或者 IL-7-膜表面标签-跨膜区的结构。在多个 IL-7 的实施方案中，膜表面标签可以位于任意 IL-7 的 N 端和 C 端。例如，在两个 IL-7 的情况下，所述膜表面细胞因子可以具有：膜表面标签-第一 IL-7-第二 IL-7-跨膜区，或者第一 IL-7-膜表面标签-第二 IL-7-跨膜区，或者第一 IL-7-第二 IL-7-膜表面标签-跨膜区的结构。以此类推。优选地，所述 IL-7 位于膜表面标签的 N 端。

在多个膜表面标签的实施方案中，该多个膜表面标签可以串联或分散在膜表面细胞因子胞外的任意位置（例如任意 IL-7 的 N 端和 C 端），只要它们都位于跨膜区的 N 端并且不影响膜表面标签和膜表面细胞因子的功能即可。

在跨膜区 N 端（例如所述膜表面标签和跨膜区之间）可以具有铰链区或接头，或者可以具有不影响膜表面细胞因子功能的任意序列，例如信号肽、或其他需要在膜表面表达的多肽。铰链区包括但不限于：CD4 胞外铰链区、CD8 胞外铰链区、CD28 胞外铰链区、IgG1Fc 铰链区和 IgG4Fc 铰链区。优选地，所述铰链区为 CD8 胞外铰链区。优选地，所述 CD8 胞外铰链区的序列如 SEQ ID NO:19 所示；其示例性编码序列如 SEQ ID NO:20 所示。接头为刚性接头或软性接头，其序列如 SEQ ID NO: 9、11、13、15、17 所示；其示例性编码序列分别如 SEQ ID NO:10、12、14、16、或 18 所示。优选地，所述刚性接头的序列为选自 SEQ ID NO:9、11、15、17 中的任一种。

在含有膜表面标签的实施方案中，IL-7 和膜表面标签之间可以具有接头。在一个或多个实施方案中，所述接头为刚性接头或软性接头，优选为刚性接头。优选地，所述刚性接头的序列为选自 SEQ ID NO:9、11、15、17 中的任一种。

在某些实施方案中，IL-7 和所述膜表面标签之间和膜表面标签和跨膜区之间均具有接头。

本文中，膜表面标签（或膜表面标签）包括 BCMA 胞外结构域或其保留有与抗

BCMA 抗体结合功能的变体。所述 BCMA 胞外结构域如 SEQ ID NO:21 所示；其示例性编码序列如 SEQ ID NO:22 所示。所述变体可以是保留有与抗 BCMA 抗体结合功能的截短变体、插入变体、缺失变体、取代变体或其组合。抗 BCMA 抗体的序列不受限，可以是本领域技术人员知晓的任何抗 BCMA 抗体。示例性地：所述 BCMA 胞外结构域的其截短变体如 SEQ ID NO:23 所示，其示例性编码序列如 SEQ ID NO:24 所示；所述 BCMA 胞外结构域的取代变体如 SEQ ID NO:25 所示，其示例性编码序列如 SEQ ID NO:26 所示；所述 BCMA 胞外结构域的截短的取代变体如 SEQ ID NO:27 所示，其示例性编码序列如 SEQ ID NO:28 所示。

所述膜锚定 IL-7 还可包括信号肽。本领域技术人员可以所需的表达形式选择合适的信号肽。信号肽在多肽从分泌的过程中可被切去。示例性地，所述信号肽位于所述膜锚定 IL-7 的 N 端。优选地，所述信号肽为 CD52 信号肽或 IL-7 信号肽。优选地，所述 CD52 信号肽如 SEQ ID NO:1 所示；其示例性编码序列如 SEQ ID NO:2 所示。优选地，所述 IL-7 信号肽如 SEQ ID NO:5 所示；其示例性编码序列如 SEQ ID NO:6 所示。

在一些实施方案中，本发明提供多肽或表达该多肽的 TIL，所述多肽是膜锚定 IL-7，包含依次连接的：任选的信号肽、IL-7、任选的接头、BCMA 胞外区或其变体、任选的铰链区或接头、和跨膜区，所述信号肽是 CD52 信号肽或 IL-7 信号肽，所述跨膜区是 CD8 跨膜区或 CD52。在一些优选的实施方案中，所述膜锚定 IL-7 包含依次连接的：信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和跨膜区。在一些优选的实施方案中，所述膜锚定 IL-7 包含依次连接的：（1）CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，（2）CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD52，（3）CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，（4）CD52 信号肽、IL-7、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，（5）IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，或（6）IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD52。在示例性实施方案中，所述膜锚定 IL-7 的氨基酸序列为选自 SEQ ID NO:31、33、35、37、39、41、43 和 45 中的任一种或几种。其示例性编码核酸序列为选自 SEQ ID NO:32、34、36、38、40、42、44 和 46 中的任一种或几种。

本发明还包括上述多肽的片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片段”、

“衍生物”和“类似物”是指基本上保持所述多肽相同的生物学功能或活性的多肽。多肽或结构域的片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽或结构域，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽或结构域，或(iii)成熟多肽或结构域与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽或结构域序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与抗原 IgG 片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

术语“变体”或“突变体”是指与参照序列相比，通过一个或多个氨基酸的插入、缺失或取代使氨基酸序列发生变化但保留至少一种生物活性的肽或多肽。本文任一实施方案所述的突变体包括与参照序列（如本文所述的 SEQ ID NO: 2、4、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、12 或 14 所编码的氨基酸序列）具有至少 70%，优选至少 80%，优选至少 85%，优选至少 90%，优选至少 95%，优选至少 97%的序列相同性并保留参照序列的生物学活性(如作为嵌合抗原受体、表面细胞因子表达蛋白、信号转换受体)的氨基酸序列。可采用例如 NCBI 的 BLASTp 计算两条比对的序列之间的序列相同性。突变体还包括在参照序列的氨基酸序列中具有一个或多个突变(插入、缺失或取代)、同时仍保留参照序列生物学活性的氨基酸序列。所述多个突变通常指 1-10 个以内，例如 1-8 个、1-5 个或 1-3 个。取代优选是保守性取代。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行保守性取代时，通常不会改变蛋白质或多肽的功能。“性能相近或相似的氨基酸”包括例如，具有相似侧链的氨基酸残基的家族，这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有β-分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，在本发明多肽中用来自同一侧链类的另一氨基酸残基替换一个或几个位点，将不会在实质上影响其活性。

多肽或结构域的截短变体也可以用于本发明，只要该变体基本上保持与多肽或结构域相同的生物学功能或活性，例如保持 BCMA 胞外结构域与抗体的抗原抗体反

应性的 BCMA 胞外结构域截短变体。

本文所述多肽可以是经过修饰的多肽。修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

编码所述多肽或结构域的核酸分子也在本文的范围内。核酸分子可以是 DNA 形式或 RNA 形式。本文所述核酸分子包括经密码子优化而发生变化的序列，只要核酸分子所编码的氨基酸序列不变即可。经密码子优化的序列可对具体物种表现出更适合的表达性。本领域周知对核酸分子序列进行密码子优化的方法。编码成熟多肽的编码区序列可以是简并的变异体。如本文所用，“简并的变异体”是指编码由序列表中所示核酸序列所编码的氨基酸序列或其结构域片段，但与相应核酸序列有差别的核酸序列。

编码成熟多肽的核酸分子包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。术语“编码多肽的核酸分子”可以是包括编码此多肽的核酸分子，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的核酸分子。

本发明的核酸分子可以是多肽或结构域的编码序列，或者是多肽或结构域的表达框。本文中，编码序列指核酸序列中直接确定其蛋白产物（例如 CAR、单链抗体、铰链区、跨膜区、胞内信号区或细胞因子蛋白）的氨基酸序列的部分。编码序列的边界通常是由紧邻 mRNA 5’端开放读码框上游的核糖体结合位点（对于原核细胞）和紧邻 mRNA 3’端开放读码框下游的转录终止序列确定。编码序列可以包括，但不限于 DNA、cDNA 和重组核酸序列。本文中，表达框指表达感兴趣基因所需的完整元件，包括启动子、基因编码序列和 PolyA 加尾信号序列。在某些实施方案中，所述编码序列或表达框整合到细胞的基因组中。因此，在这些实施方案中，本文所述的细胞的基因组中稳定整合了包含编码本文所述多肽的表达框。

本发明还涉及上述核酸分子的变异体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的，等位变异体是一个多核苷酸的替换形式，它可能是一个或

多个核苷酸的取代、缺失或插入，但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，较佳地至少 70%，更佳地至少 80%、85%、90%、95%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件(或严紧条件)下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 0.2×SSC，0.1%SDS，60℃；或(2)杂交时加有变性剂，如 50%(v/v)甲酰胺，0.1%小牛血清/0.1% Ficoll，42℃等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90%以上，更好是 95%以上时才发生杂交。

本发明还涉及上述序列的互补序列或与上述序列杂交的核酸片段。如本文所用，“核酸片段”的长度至少含 15 个核苷酸，较好是至少 30 个核苷酸，更好是至少 50 个核苷酸，最好是至少 100 个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如 PCR)以确定和/或分离编码所需多肽或结构域的多聚核苷酸。本文所述“杂交”主要指在严谨条件下的核酸序列配对。示例性严谨条件为在 0.1×SSPE（或 0.1×SSC）、0.1% SDS 的溶液中，65℃条件下杂交并洗膜。

在某些实施方案中，所述核酸分子是核酸构建物，其含有本文所述多肽的编码序列，以及与这些序列操作性连接的一个或多个调控序列。本发明所述的多核苷酸可以多种方式被操作以保证多肽的表达。在将核酸构建物插入载体之前可根据表达载体的不同或要求而对核酸构建物进行操作。利用重组 DNA 方法来改变多核苷酸序列的技术是本领域已知的。

调控序列可以是合适的启动子序列。启动子序列通常与待表达蛋白的编码序列操作性连接。启动子可以是在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列，包括突变的、截短的和杂合启动子，并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。调控序列也可以是合适的转录终止子序列，由宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列与编码该多肽的核苷酸序列的 3’末端操作性连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本文。调控序列也可以是合适的前导序列，对宿主细胞翻译重要的 mRNA 的非翻译区。前导序列与编码该多肽的核苷酸序列的 5’末端可操作连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

在某些实施方案中，所述核酸构建物是载体。载体可以是克隆载体，也可以是表达载体，或者是同源重组载体。具体而言，可将本文多肽的编码序列克隆入许多类型的载体，包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。克隆载体

可用于提供本发明多肽的编码序列。表达载体可以以载体形式提供给细胞。通常通过可操作地连接本发明的编码序列至启动子，并将构建体并入表达载体，实现本发明多核苷酸的表达。该载体对于复制和整合真核细胞可为合适的。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。载体可以是病毒，可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒等。载体技术在本领域中是公知的并在例如 Sambrook 等(2001，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory，New York)和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。同源重组载体用于将本文所述的表达框整合到宿主基因组中。

通常，合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记。

合适的启动子包括但不限于即时早期巨细胞病毒（CMV）启动子序列、延伸生长因子-1α（EF-1α）、类人猿病毒 40（SV40）早期启动子、小鼠乳癌病毒（MMTV）、人免疫缺陷病毒（HIV）长末端重复（LTR）启动子、MoMuLV 启动子、鸟类白血病病毒启动子、EB 病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子，诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子等。

为了评估多肽的表达，导入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因，以便于从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。可选择的标记可被携带在单独一段 DNA 上并用于共转染程序。可选择的标记两者的侧翼都可具有适当的调节序列，以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记包括例如抗生素抗性基因，诸如 neo 等等。

本文所述的多核苷酸通常可以用 PCR 扩增法获得。具体而言，可根据本文所公开的核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。或者，也可直接合成本文所述的核酸分子。

将核酸分子导入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。核酸分子如载体或 mRNA 可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞，例如，哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如，表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质纳米颗粒转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔（电转）等等。生物学方法包括使用 DNA 和 RNA 载体。化学手段包括胶体

分散系统，诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠；和基于脂质的系统，包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。

如本文所述，宿主细胞表达本文所述的多肽或含有本文所述的核酸分子。宿主细胞既包括最终的目的细胞（例如 TIL），也包括生产目的细胞过程中使用到的各种细胞，如大肠杆菌细胞，以用于如提供本发明蛋白的编码序列或提供本文所述的载体。在某些实施方案中，本文提供一种稳定表达本文所述多肽（膜锚定 IL-7）的 TIL。通常，在导入膜锚定 IL-7 之前，TIL 不表达膜锚定 IL-7 的 TIL，或者，TIL 是未经任何修饰的 TIL。

适用于本发明的 TIL 可以是各种来源的各种类型的 TIL，例如来源于含肿瘤细胞的组织。通常所述含肿瘤细胞的组织经过预处理，包括碎片化和/或解离肿瘤组织。碎片化和/或解离的肿瘤组织的直径为约 1mm-约 10mm，例如，可以是约 2mm-约 10mm、约 3mm-约 10mm、约 4mm-约 10mm、约 5mm-约 10mm、约 6mm-约 10mm、约 7mm-约 10mm 或者约 8mm-约 10mm。所述肿瘤细胞来源于选自下组的肿瘤：黑色素瘤、胶质瘤、甲状腺肿瘤、胃癌、肺癌、胃肠道间质瘤、肠癌、肝癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜间质肉瘤、盆腔低分化腺癌、胆囊癌、胆管癌、头颈癌、结直肠癌、脑胶质瘤、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、肾癌和骨肉瘤。优选地，所述含肿瘤细胞的组织是癌症对象的肿瘤组织或体液。所述体液包括血液、胸积液、组织液、淋巴液和/或腹水。例如，所述体液可以包括腹腔积液（例如可以为胃癌患者的腹腔积液、或者乳腺癌患者的腹腔积液）和/或胸腔积液（例如可以为子宫内膜间质肉瘤患者的胸腔积液）。

TIL 的制备方法不受限，在优选实施方案中，使用 PCT/CN2021/133059 中所述的方法获取 TIL，其通过引用全文被纳入本申请。在示例性实施方案中，所述 TIL 通过以下方法制备：用 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得 TIL 细胞群。

本文的 TIL 种子细胞培养基包括本领域已知的任何 TIL 种子培养基，例如 PCT/CN2021/096585 或 PCT/CN2021/133059 中记载的 TIL 种子细胞培养基，其通过引用全文被纳入本申请。在具体实施方案中，TIL 种子细胞培养基包括以下的组分：细胞培养成分、细胞因子和免疫检查点抗体或其抗原结合片段，其中所述细胞因子包括 IL-2，所述免疫检查点包括：PD-1、LAG-3、TIGIT 和/或 CTLA-4，所述细胞培养成分为血清培养基或无血清培养基。在一个或多个实施方案中，IL-2 的浓度为约 3000IU/mL 以下。所述细胞因子还可包括 IL-7、IL-15、TNFα、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、IFN-γ、IFN-α、IFN-β、IL-4、IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-9、IL-18、IL-12、

IL-21、IL-10 中的一种或多种。示例性地，所述 IL-7 的浓度为约 200-约 1000U/mL；所述 IL-15 的浓度为约 200-约 500U/mL。；所述 TNF α 的浓度为约 10-约 100pg/mL；所述 GM-CSF 的浓度为约 200-约 5000U/mL。所述 G-CSF 的浓度为约 300U/mL-约 1000U/mL；所述 M-CSF 的浓度为约 300U/mL-约 800U/mL；所述 IFN-γ的浓度为约 10-约 1000ng/mL；所述 IFN-γ的浓度为约 300-约 1000U/mL；所述 IFN-α的浓度为约 500U/mL-约 1000U/mL；所述 IFN-β的浓度为约 200U/mL-约 500U/mL；所述 IL-4 的浓度为约 200-约 500U/mL；所述 IL-1α的浓度为约 200-约 500U/mL；所述 IL-1β的浓度为约 200-约 500U/mL；所述 IL-6 的浓度为约 200-约 500U/mL；所述 IL-9 的浓度为约 200-约 500U/mL；所述 IL-18 的浓度为约 200-约 500U/mL；所述 IL-12 的浓度为约 200-约 1000U/mL；所述 IL-21 的浓度为约 200-约 500U/mL；所述 IL-10 的浓度为约 200-约 500U/mL。

TIL 种子细胞培养基中的免疫检查点抗体或其抗原结合片段可以是人 PD-1 抗体或其抗原结合片段、浓度为约 1-约 100μg/mL，或者为 LAG-3 抗体或其抗原结合片段、浓度为约 3-约 10μg/mL，或者为 TIGIT 抗体或其抗原结合片段、浓度为约 1-约 25μg/mL，或者为 CTLA-4 抗体或其抗原结合片段、浓度为约 1-约 100μg/mL。

TIL 种子细胞培养基还可包括共刺激受体抗体或其抗原结合片段，例如：CD40 抗体或其抗原结合片段、OX-40 抗体或其抗原结合片段、CD137 抗体或其抗原结合片段和/或 CD28 抗体或其抗原结合片段。CD137 抗体或其抗原结合片段的浓度为约 1-约 100μg/mL；CD28 抗体或其抗原结合片段的浓度为约 1-约 10μg/mL；CD40 抗体或其抗原结合片段的浓度为约 5-约 10μg/mL；OX-40 抗体或其抗原结合片段的浓度为约 3-约 10μg/mL。

此外，种子细胞培养基还可包括 M2 型巨噬细胞抑制剂，例如 RRx001 和/或 CNI-1493。M2 型巨噬细胞抑制剂的浓度为约 0.1-约 100μM。所述种子细胞培养基还可包括调控 T 细胞抑制剂，例如 CAL-101、达沙替尼（dasatinib）、伊马替尼（imatinib）和/或帕比司他（Panobinostat）。调控 T 细胞抑制剂的浓度为约 0.1-约 100μM。所述的种子细胞培养基还可包括骨髓来源的抑制性细胞（MDSC）抑制剂，例如 AG490、地西他滨（decitabine）、舒尼替尼和/或 BBI608。所述骨髓来源的抑制性细胞抑制剂的浓度为约 0.1-约 100μg/mL。所述种子细胞培养基还包括 T 细胞激活剂，例如 LYC-55716、GNE-1858 和/或亚甲基蓝。所述 T 细胞激活剂的浓度为约 1-约 10μM。所述的种子细胞培养基还可包括 T 细胞分化抑制剂，例如 TWS119。所述 T 细胞分化抑制剂的浓度为约 1-约 10μM。

在具体实施方案中，TIL 种子细胞培养基包括以下组分的组合中的任一种：1）IL-2、IL-6、IL-21、IFN-γ、TIGIT 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；2）IL-2、IL-4、IL-10、IL-21、CD137 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；3）IL-2、IL-7、IL-12、IL-21、CD137 抗体、CD28 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；4）IL-1β、IL-2、IL-7、G-CSF、GM-CSF、IFN-γ、LAG3 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；5）IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、M-CSF、IFN-β、IFN-γ、TIGIT 抗体、CTLA-4 抗体和基础培养基；6）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、CD137 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；7）IL-2、IL-4、IL-10、IL-15、G-CSF、M-CSF、CD28 抗体、OX-40 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；8）IL-2、IL-7、IL-15、IFN-γ、CD137 抗体、CD40 抗体、OX-40 抗体、TIGIT 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；9）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、IFN-γ、CD137 抗体、CD28 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；10）IL-2、IL-7、IL-12、G-CSF、GM-CSF、IFN-α、IFN-γ、CD28 抗体、CD40 抗体、TIGIT 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；11）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、PD-1 抗体、RRx-001、CAL-101 和基础培养基；12）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、M-CSF、PD-1 抗体、CNI-1493 和基础培养基；13）IL-2、IL-7、IL-15、CD137 抗体、CD28 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、达沙替尼和基础培养基；14）IL-2、IL-6、IL-12、G-CSF、M-CSF、IFN-β、IFN-γ、CTLA-4 抗体、PD-1 抗体、达沙替尼、LYC-55716、GENE-1858 和基础培养基；15）IL-1α、IL-2、IL-9、IL-15、GM-CSF、CD137 抗体、CD28 抗体、LAG3 抗体、TIGIT 抗体、CNI-1493 和基础培养基；16）IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、G-CSF、M-CSF、IFN-γ、CD28 抗体、CD40 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、CNI-1493、达沙替尼、GNE-1858 和基础培养基。优选地，上述组分的组合中还包括血清和/或抗生素。血清浓度为约 1-约 10%（v/v）。抗生素包括青霉素和/或链霉素（例如 PS 双抗）。抗生素浓度为约 1-约 200U/mL。

在其他实施方案中，所述 TIL 通过以下方法制备：（1）用 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得第一 TIL 细胞群，和（2）用 TIL 细胞扩增培养基孵育第一 TIL 细胞群，获得第二 TIL 细胞群。所述 TIL 种子细胞培养基如上所述。

TIL 细胞扩增培养基可为本领域中可以使 TIL 细胞增殖的任何培养基，例如 PCT/CN2021/133059 中记载的用于扩增 TIL 细胞的培养组合物以及含有所述培养组合物的 TIL 细胞扩增培养基，该文献通过引用全文被纳入本申请。在具体实施方案中，所述 TIL 细胞扩增培养基包含 IL-2、IL-7、IL-15、免疫检查点抗体或其抗原结合

片段和基础培养基。此外，所述扩增培养基还包括 IL-21、IL-12、GM-CSF、和提升记忆 T 细胞比例的小分子中的任一种、两种、三种或四种。优选地，所述扩增培养基还包括 IL-21 和 IL-12，或 IL-21、IL-12 和 GM-CSF，或 GM-CSF 和提升记忆 T 细胞比例的小分子。优选地，所述提升记忆 T 细胞比例的小分子是 TWS119。所述免疫检查点抗体包括选自 PD-1 抗体、CTLA-4 抗体、LAG3 抗体、TIM3 抗体、TIGIT 抗体和 BTLA 抗体中的任一种或多种。

所述 TIL 细胞扩增培养基还可包括自体血小板或异体血小板。所述 TIL 细胞扩增培养基还可包括选自 CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体、OX40 抗体、GITR 抗体、ICOS 抗体、CD206 抗体和 CD40 抗体中的任一种或多种。优选地，所述培养组合物还包括选自 CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体、GITR 抗体中的任一种、两种、三种或四种。例如，所述扩增培养基还包括（1）CD3 抗体和 CD28 抗体，或（2）CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体和 GITR 抗体。

在一个或多个实施方案中，所述 TIL 细胞扩增培养基包含以下组分的组合中的任一种：17）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体和 GM-CSF；18）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体和 GITR 抗体；19）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、CD3 抗体和 CD28 抗体，优选地，所述 CD3 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；20）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体和 GM-CSF，优选地，所述 CD3 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；21）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体和 CD137 抗体，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；22）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、GITR 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、TWS119 和 CD137 抗体，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；23）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、TIGIT 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体和 GM-CSF，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；24）IL-2、IL-7、IL-15、LAG3 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体和 GITR 抗体，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；25）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、TIGIT 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体、CD40 抗体、OX-40 抗体和自体血小板，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；26）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、CTLA-4 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体、GITR 抗体、GM-CSF、TWS119 和异体血小板，优选地，所述 CD3 抗体和 CD28 抗体与基质偶联。

在一个或多个实施方案中，所述 TIL 细胞扩增培养基包含选自以下任一项的组分和基础培养基，任选还包含血清和/或血小板：（1）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、和 3-100 μg/mL 的 PD-1 抗体，或这些组分的等比浓缩物；（2）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、和 1-100 μg/mL 的 PD-1 抗体，或这些组分的等比浓缩物；（3）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、3-100 μg/mL 的 PD-1 抗体、5-100ng/mL 的 IL-21、5-100ng/mL 的 IL-12、1-10 μg/mL 的 CD3 抗体、1-10 μg/mL 的 CD28 抗体和 200-5000U/mL 的 GM-CSF，或所述组分的等比浓缩物；（4）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、3-100 μg/mL 的 PD-1 抗体、5-100ng/mL 的 IL-21、5-100ng/mL 的 IL-12、1-10 μg/mL 的 CD3 抗体、0.5-10 μg/mL 的 CD28 抗体和 200-5000U/mL 的 GM-CSF，或所述组分的等比浓缩物；（5）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、3-100 μg/mL 的 PD-1 抗体、5-100ng/mL 的 IL-21、5-100ng/mL 的 IL-12、1-10 μg/mL 的 CD3 抗体、1-10 μg/mL 的 CD28 抗体、1-100 μg/mL 的 CD137 抗体和 1-100 μg/mL 的 GITR 抗体，或这些组分的等比浓缩物；（6）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、1-100 μg/mL 的 PD-1 抗体、5-100ng/mL 的 IL-21、5-100ng/mL 的 IL-12、0.5-10 μg/mL 的 CD3 抗体、1-10 μg/mL 的 CD28 抗体、1-100 μg/mL 的 CD137 抗体和 1-100 μg/mL 的 GITR 抗体，或这些组分的等比浓缩物；（7）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、3-100 μg/mL 的 PD-1 抗体、1-10 μg/mL 的 CD3 抗体、1-10 μg/mL 的 CD28 抗体、1-100 μg/mL 的 CD137 抗体、1-100 μg/mL 的 GITR 抗体、200-5000U/mL 的 GM-CSF 和 1-500 μM 的 TWS119，或这些组分的等比浓缩物；（8）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、1-100 μg/mL 的 PD-1 抗体、偶联于基质的 CD3 抗体、偶联于基质的 CD28 抗体、1-100 μg/mL 的 CD137 抗体和 1-100 μg/mL 的 GITR 抗体，或这些组分的等比浓缩物；（9）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、1-100 μg/mL 的 PD-1 抗体、5-100ng/mL 的 IL-21、5-100ng/mL 的 IL-12、偶联于基质的 CD3 抗体、偶联于基质的 CD28 抗体、1-100 μg/mL 的 CD137 抗体和 1-100 μg/mL 的 GITR 抗体，或这些组分的等比浓缩物；（10）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、1-100 μg/mL 的 PD-1 抗体、偶联于基质的 CD3 抗体、偶联于基质的 CD28 抗体和偶联于基质的 CD137 抗体，或这些组分的等比浓缩物；（11）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7 、5-100ng/mL 的

IL-15、1-100μg/mL 的 PD-1 抗体、偶联于基质的 CD3 抗体、偶联于基质的 CD28 抗体、偶联于基质的 CD137 抗体、1-100μg/mL 的 GITR 抗体和 1-500μM 的 TWS119，或这些组分的等比浓缩物；（12）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、1-100μg/mL 的 PD-1 抗体、偶联于基质的 CD3 抗体、偶联于基质的 CD28 抗体、偶联于基质的 CD137 抗体、1-100μg/mL 的 TIGIT 抗体和 200-5000U/mL 的 GM-CSF，或这些组分的等比浓缩物；（13）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、1-100μg/mL 的 LAG-3 抗体、5-100ng/mL 的 IL-21、5-100ng/mL 的 IL-12、0.5-10μg/mL 的 CD3 抗体、0.5-10μg/mL 的 CD28 抗体、1-100μg/mL 的 CD137 抗体和 1-100μg/mL 的 GITR 抗体，或这些组分的等比浓缩物；（14）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、1-100μg/mL 的 PD-1 抗体、偶联于基质的 CD3 抗体、偶联于基质的 CD28 抗体、偶联于基质的 CD137 抗体、1-100μg/mL 的 TIGIT 抗体、1-100μg/mL 的 CD40 抗体、1-100μg/mL 的 OX-40 抗体和 1×10^8-5×10^8/mL 的自体血小板，或这些组分的等比浓缩物；（15）200-6000 IU/mL 的 IL-2、5-100ng/mL 的 IL-7、5-100ng/mL 的 IL-15、1-100μg/mL 的 PD-1 抗体、1-100μg/mL 的 CTLA-4 抗体、偶联于基质的 CD3 抗体 、偶联于基质的 CD28 抗体、1-100μg/mL 的 CD137 抗体、1-100μg/mL 的 GITR 抗体、200-5000U/mL 的 GM-CSF 和 1×10^8-5×10^8/mL 的异体血小板，或这些组分的等比浓缩物。

本文培养基中的抗体可以是来自任何物种的抗体或重组抗体，优选单克隆抗体。这些抗体本领域周知，例如 PD-1 抗体百泽安、PD-1 抗体信迪利、PD-1 抗体特瑞普利、PD-1 抗体艾瑞卡、CD3 抗体 ab86883、CD28 抗体 MAB342、GITR 抗体如 CN103951753B 中 SEQ ID NO:104 和 SEQ ID NO:105 所示、CD137 抗体如 CN111182919A 中 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 所示。这些专利文献或公开通过引用全文纳入本申请。本文所述的 TIL 细胞种子培养基和/或扩增培养基中的一种或多种抗体可与基质偶联，例如微球、孔板、平皿、细胞培养瓶或细胞培养袋。

本文所述血清可以是本领域已知可用于动物细胞（例如 TIL 细胞）培养的任何血清，例如人 AB 血清、对象自体血清或动物源血清。血清的浓度为 1-10%，例如 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%，或上述数值的任意两个之间的范围。

本文所述血小板可以是对象血液来源的血小板或异体血液来源的血小板。血小板的密度为 0.5×10^8/mL-3×10^8/mL，例如 0.5×10^8/mL、1×10^8/mL、1.5 $\times10^8$/mL、2×10^8/mL、2.5×10^8/mL、3×10^8/mL，或上述数值的任意两个之间的范围。

本文所述“基础培养基”是本领域已知的任何可用于 TIL 细胞培养的培养基，包括但不限于 AIM-V、X-VIVO、DMEM、RPMI1640、OpTmizerTM 和 FUJIFILM Irvin MHM-C 中的任一种或几种。这些培养基的组分和含量本领域周知，其来源如实施例中所述。

将 TIL（未电转或经电转的）接种入 TIL 细胞扩增培养基的浓度不受限制，可由本领域技术人员选择。在优选实施方案中，以 2.0×10^5-5.0×10^5 个/mL 的浓度将 TIL 接种入 TIL 细胞扩增培养基，例如约 2.0×10^5、约 2.5×10^5、约 3.0×10^5、约 4.5×10^5 个/mL 或任意两个数值之间的范围。

本文所述“培养”或“孵育”的时间可以为约 3-20 天。例如，所述培养或孵育时间可以为约 3-15 天，例如，可以为约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 8 天、约 9 天、约 10 天、约 11 天、约 12 天、约 13 天、约 14 天、约 15 天、约 16 天、约 17 天、约 18 天、约 19 天或者约 20 天或任意两个数值之间的范围。在使用 TIL 细胞培养期间（例如使用 TIL 细胞扩增培养基孵育 TIL 细胞期间），可每隔 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 天更新相应培养基。

例如，所述培养或孵育的温度可以为约 30-42℃。例如，可以为至少约 30℃、至少约 31℃、至少约 32℃、至少约 33℃、至少约 34℃、至少约 35℃、至少约 36℃、至少约 37℃、至少约 38℃、至少约 39℃、至少约 40℃、至少约 40℃或者至少约 42℃。

例如，所述培养或孵育的 CO_2 浓度为约 1%-10%，例如，可以为至少约 1%、至少约 2%、至少约 3%、至少约 4%、至少约 5%、至少约 6%、至少约 7%、至少约 8%、至少约 9%或者至少约 10%。

本发明包括制备所述修饰的 TIL 的方法以及由此获得的修饰的 TIL，所述方法包括将本文所述膜锚定 IL-7 或其编码核酸分子导入如上培养获得的 TIL 的步骤。在一些实施方案中，通过电转实现所述导入。导入（例如电转）编码序列后的细胞在进行后续操作（例如培养）前，可经过激活（或活化）。通常，激活通过将电转的细胞在 TIL 细胞扩增培养基中孵育至少 1 天来进行。所述 TIL 细胞扩增培养基中的抗体可包被在容器表面或悬浮在培养基中。所述孵育优选 1-10 天，例如 1-5 天。所述孵育的条件可由本领域技术人员确定，例如 37℃ 5%CO_2。在一些实施方案中，激活孵育时，电转的细胞在 TIL 细胞扩增培养基中的重悬浓度为 1.0×10^5-1.0×10^6 个/mL，例如 1.0×10^5、2.0×10^5、2.5×10^5、5.0×10^5、5.2×10^5、1.0×10^6 个/mL 或任意两个数值之间的范围。

因此，在一个或多个实施方案中，本发明提供一种修饰的 TIL，其表达本文所述

的膜锚定 IL-7，所述修饰的 TIL 通过以下方法制备：1）用本文所述 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得第一 TIL 细胞群，2）将编码所述膜锚定 IL-7 的核酸分子（例如表达载体）导入（例如通过电转）所述第一 TIL 细胞群，获得稳定表达膜锚定 IL-7 的第二 TIL 细胞群，和任选的 3）激活电转的细胞。

在一个或多个实施方案中，本发明提供一种修饰的 TIL，其表达本文所述的膜锚定 IL-7，所述修饰的 TIL 通过以下方法制备：1）用本文所述的 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得第一 TIL 细胞群，2）用本文所述的 TIL 细胞扩增培养基孵育所述第一 TIL 细胞群，获得第二 TIL 细胞群，3）将编码所述膜锚定 IL-7 的核酸分子（例如表达载体）导入（例如通过电转）所述第二 TIL 细胞群，获得稳定表达膜锚定 IL-7 的第三 TIL 细胞群，和任选的 4）激活电转的细胞。

在一个或多个实施方案中，本发明提供一种修饰的 TIL，其表达本文所述的膜锚定 IL-7，所述修饰的 TIL 通过以下方法制备：1）用本文所述的 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得第一 TIL 细胞群，2）将编码所述膜锚定 IL-7 的核酸分子（例如表达载体）导入（例如通过电转）所述第一 TIL 细胞群，获得第二 TIL 细胞群，任选的 3）激活电转的细胞，和 4）用本文所述的 TIL 细胞扩增培养基孵育所述第二 TIL 细胞群，获得稳定表达膜锚定 IL-7 的第三 TIL 细胞群。

在制备本文的修饰的 TIL 的一些实施方案中，TIL 种子细胞培养基选自以下（a）、（b）和（c）中任一种或多种：TIL 种子细胞培养基（a）：IL-2（3000U/mL）、IL-7（50ng/mL）、IL-15（50ng/mL）、IFN-γ（1000U/mL）、抗 CD137 激活型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 CD40 激活型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 OX-40 激活型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 TIGIT 封闭型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 PD-1 封闭型单克隆抗体（15μg/mL）、PS 双抗（100U/mL）和补至终体积的 X-VIVO 15 基础培养基；TIL 种子细胞培养基（b）：IL-2（3000U/mL）、IL-7（20ng/mL）、IL-15（20ng/mL）、GM-CSF（500U/mL）、IFN-γ（1000U/mL）、抗 CD137 激活型单克隆抗体（3μg/mL）、抗 CD28 激活型单克隆抗体（3μg/mL）、抗 PD-1 封闭型单克隆抗体（3μg/mL）、TNF-α（10pg/mL）和补至终体积的 X-VIVO 15 基础培养基；TIL 种子细胞培养基（c）：IL-2（3000U/mL）、IL-7（20ng/mL）、IL-15（30ng/mL）、抗 CD137 激活型抗体（12μg/mL）、抗 CD28 激活型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 LAG-3 封闭型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 PD-1 封闭型单克隆抗体（3μg/mL）、达沙替尼（3μM）、5 v/v %人 AB 血清和补至终体积的 X-VIVO 15 基础培养基。或者或此外，在制备本文的修饰的 TIL 的一些实施方案中，TIL 细胞扩增培养基选自以下（d）和（e）中任

一种或多种：TIL 细胞扩增培养基（d）：IL-2（500U/mL）、IL-7（5ng/mL）、IL-15（10ng/mL）、抗 PD-1 封闭型单克隆抗体（3μg/mL）、抗 CD3 激活型单克隆抗体、抗 CD28 激活型单克隆抗体，5v/v%人 AB 血清和补至终体积的 X-VIVO 15 基础培养基。所述抗 CD3 激活型单克隆抗体和抗 CD28 激活型单克隆抗体包被在培养器皿表面；TIL 细胞扩增培养基（e）：IL-2（500U/mL）、IL-7（7ng/mL）、IL-15（30ng/mL）、抗 PD-1 封闭型单克隆抗体（1μg/mL）、抗 CD3 激活型单克隆抗体、抗 CD28 激活型单克隆抗体、抗 CD137 激活型单克隆抗体、5v/v%人 AB 血清和补至终体积的 X-VIVO 15 基础培养基，所述抗 CD3 激活型单克隆抗体、抗 CD137 激活型单克隆抗体和抗 CD28 激活型单克隆抗体包被在培养器皿表面。在制备本文的修饰的 TIL 的具体实施方案中，使用如下所示的 TIL 种子细胞培养基与 TIL 细胞扩增培养基的组合：（a）和（d）、（a）和（e）、（b）和（d）、（b）和（e）、（c）和（d）、或（c）和（e）。

在具体的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自胃癌组织黑色素瘤、卵巢癌组织、宫颈癌组织、肠癌组织、肺癌组织、骨肉瘤、或宫颈癌复发膀胱转移组织；膜锚定 IL-7 包含依次连接的：（i）CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，（ii）CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD52，（iii）CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，（iv）CD52 信号肽、IL-7、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，（v）（vi）IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，或（vii）IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD52；用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）或（b）或（c）；在种子细胞培养基中的培养时长为约 11-15 天；TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（d）或（e）；在扩增培养基中的培养时长为约 11-15 天；扩增培养基的细胞接种密度为 2.0×10^5-4.5×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:31、33、35、37、39、41、43 和 45 中任一或多个所示。

在第一套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自胃癌组织，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体和 CD52，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 11 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（e）、在扩增培养基中的培养时长为约 12 天、扩增培养基的细胞接种密度为 2.5×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:31 所示。

在第二套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自黑色素瘤，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体和 CD52，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（b）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 12 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（d）、在扩增培养基中的培养时长为约 12 天、扩增培养基的细胞接种密度为 2.5×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:33 所示。

在第三套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自卵巢癌组织，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体和 CD52，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 12 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（e）、在扩增培养基中的培养时长为约 12 天、扩增培养基的细胞接种密度为 2.0×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:33 所示。

在第四套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自宫颈癌组织，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体和 CD52，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 12 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（e）、在扩增培养基中的培养时长为约 12 天、扩增培养基的细胞接种密度为 2.5×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:31 所示。

在第五套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自卵巢癌组织，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体和 CD52，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 12 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（e）、在扩增培养基中的培养时长为约 11 天、扩增培养基的细胞接种密度为 2.5×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:35 所示。

在第六套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自肠癌组织，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 CD52 信号肽、IL-7、BCMA 胞外区或其变体、接头和 CD52，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 13 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（e）、在扩增培养基中的培养时长为约 11 天、扩增培养基的细胞接种密度为 2.5×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:39 所示。

在第七套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自肺癌组

织，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体和 CD52，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 12 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（e）、在扩增培养基中的培养时长为约 12 天、扩增培养基的细胞接种密度为 3.0×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:41 所示。

在第八套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自骨肉瘤组织，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体和 CD52，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 15 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（e）、在扩增培养基中的培养时长为约 15 天、扩增培养基的细胞接种密度为 2.5×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:45 所示。

在第九套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自宫颈癌复发膀胱转移瘤组织，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体和 CD52，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 12 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（e）、在扩增培养基中的培养时长为约 12 天、扩增培养基的细胞接种密度为 2.5×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:35 所示。

在第十套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自卵巢癌组织，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 CD52 信号肽、IL-7、BCMA 胞外区或其变体、CD8 胞外铰链区和 CD52，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 12 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（e）、在扩增培养基中的培养时长为约 12 天、扩增培养基的细胞接种密度为 4.5×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:37 所示。

在第十一套的修饰的 TIL 或其制备方法的实施方案中，含 TIL 的样品源自卵巢癌组织，膜锚定 IL-7 包含依次连接的 CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体和 CD8 跨膜区，用于制备 TIL 的种子细胞培养基为前述的 TIL 种子细胞培养基（a）、在种子细胞培养基中的培养时长为约 12 天，TIL 细胞扩增培养基为前述的 TIL 细胞扩增培养基（e）、在扩增培养基中的培养时长为约 12 天、扩增培养基的细胞接种密度为 2.0×10^5。优选地，膜锚定 IL-7 的序列如 SEQ ID NO:43 所示。

由本发明方法制备得到的 TIL 细胞群可用于制备用于治疗癌症的药物。因此，本文还提供含有本文所述修饰的 TIL 以及药学上可接受辅料的药物组合物。本文中，

药学上可接受的辅料是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体、稀释剂和/或赋形剂，包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，碳水化合物，佐剂，抗氧化剂，螯合剂，离子强度增强剂和防腐剂。更具体而言，合适的药学上可接受的辅料可以是本领域常用于 TIL 细胞回输（例如静脉输注）的辅料。

通常，药物组合物中含有治疗有效量的修饰的 TIL。治疗有效量是指可在受试者中实现治疗、预防、减轻和/或缓解疾病或病症的剂量。可根据患者年龄、性别、所患病症及其严重程度、患者的其它身体状况等因素确定治疗有效量。本文中，受试者或患者通常指哺乳动物，尤其指人。

本发明还包括一种细胞疗法，包括给对象施用该修饰的 TIL，其中 TIL 被基因修饰以表达本文所述的膜锚定 IL-7。施用的细胞能够杀死接受者的肿瘤细胞。另外，TIL 细胞介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分。

本文中，适合使用本文所述药物组合物治疗的疾病与修饰的 TIL 有关。本文所述的疾病包括实体瘤和血液肿瘤，如腺癌、肺癌、结肠癌、大肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、胆管癌、胆囊癌、食管癌、胰腺癌和前列腺癌等实体瘤，以及白血病和淋巴瘤，如 B 细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病和急性髓性白血病等。

本发明的修饰的 TIL 可被单独或作为药物组合物以适于治疗(或预防)疾病的方式施用。施用的数量和频率将由各种因素确定，如患者的病症、和患者疾病的类型和严重度。组合物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方案中，本发明的多肽或细胞或药物组合物通过皮内或皮下注射（例如静脉注射）被施用给患者。或者，多肽或细胞或药物组合物可被直接注入肿瘤、淋巴结或感染位置。

在本发明的一些实施方案中，本发明的修饰的 TIL 可与本领域已知的其它疗法结合。所述疗法包括但不限于化疗、放疗和免疫抑制剂。例如，可结合本领域周知的治疗肿瘤抗原介导的疾病的放疗或化疗制剂进行治疗。

在某些实施方案中，本文还提供了一种试剂盒，所述试剂盒含有本文所述的核酸构建物例如载体。试剂盒还可含有适用于将核酸构建物转染入细胞中的各种试剂，以及任选的指导本领域技术人员将核酸构建物转染入细胞的说明书。

在某些实施方案中，本发明还提供一种细胞冻存制剂，包括本发明的修饰的 TIL 和冻存液。本文中的冻存液可以是组织冻存液或细胞冻存液，能够使本发明的 TIL 细

胞在低温条件下，如在干冰冻存或液氮冻存的条件下保持活力。优选地，所述冻存液可以是无血清冻存液，在所述细胞冻存制剂从低温复苏后无需去除即可直接对个体进行回输而对个体无明显毒副作用。

下文将以具体实施例的方式阐述本发明。应理解，这些实施例仅仅是阐述性的，并非意图限制本发明的范围。实施例中所用到的方法和材料，除非另有说明，否则均为本领域常规的材料和方法。

实施例

实施例 1 膜锚定 IL-7 的表达载体的构建

合成表 1 中的各锚定在膜表面的膜锚定 IL-7 的编码序列

表 1

名称	结构	蛋白序列	编码序列
mbIL-7-1	CD52 信号肽-IL-7-接头 1-BCMA 胞外区-CD52	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32
mbIL-7-2	CD52 信号肽-IL-7-接头 2-BCMA 胞外区- CD52	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
mbIL-7-3	CD52 信号肽-IL-7-接头 4-点突变 BCMA 胞外区- CD52	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36
mbIL-7-4	CD52 信号肽-IL-7-接头 5-截短的点突变 BCMA 胞外区-CD8 胞外铰链区-CD52	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38
mbIL-7-5	CD52 信号肽-IL-7-点突变 BCMA 胞外区-接头 4-CD52	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40
mbIL-7-6	CD52 信号肽-IL-7-接头 3-BCMA 胞外区-CD52	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
mbIL-7-7	CD52 信号肽-IL-7-接头 2-BCMA 胞外区-CD8 跨膜区	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:44
mbIL-7-8	IL-7 信号肽-IL-7-接头 2-截短的 BCMA 胞外区-CD52	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46
mbIL-7-9	CD52 信号肽-IL-7-接头 5-截短的点突变 BCMA 胞外区- CD52	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48

按照 PCT 申请 WO2022078310A1 说明书第 21 页实施例 1 记载的方法，构建 pKB20 载体。按照该实施例记载的方法，构建含有 mbIL-7-1、mbIL-7-2、mbIL-7-3、mbIL-7-4、mbIL-7-5、mbIL-7-6、mbIL-7-7、mbIL-7-8 和 mbIL-7-9 的表达框的 pKB20 载体，分别命名为 pKB20-mbIL-7-1、pKB20-mbIL-7-2、pKB20-mbIL-7-3、pKB20-mbIL-7-4、pKB20-mbIL-7-5、pKB20-mbIL-7-6、pKB20-mbIL-7-7、pKB20-mbIL-7-8 和

pKB20-mbIL-7-9。将获得的重组质粒转化到 E. coli（DH5c），经测序正确后，使用 Qiagen 公司的质粒纯化试剂盒提取并纯化质粒，获得各重组表达载体的高品质质粒。

实施例 2 表达膜锚定 IL-7 的 TIL 的制备

使用的 TIL 种子细胞培养基和 TIL 细胞扩增培养基的成分和编号如下：

TIL 种子细胞培养基：

（a）IL-2（3000U/mL）、IL-7（50ng/mL）、IL-15（50ng/mL）、IFN-γ（1000U/mL）、抗 CD137 激活型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 CD40 激活型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 OX-40 激活型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 TIGIT 封闭型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 PD-1 封闭型单克隆抗体（15μg/mL）、PS 双抗（100U/mL）和补至终体积的 X-VIVO 15 基础培养基；

（b）IL-2（3000U/mL）、IL-7（20ng/mL）、IL-15（20ng/mL）、GM-CSF（500U/mL）、IFN-γ（1000U/mL）、抗 CD137 激活型单克隆抗体（3μg/mL）、抗 CD28 激活型单克隆抗体（3μg/mL）、抗 PD-1 封闭型单克隆抗体（3μg/mL）、TNF-α（10pg/mL）和补至终体积的 X-VIVO 15 基础培养基；

（c）IL-2（3000U/mL）、IL-7（20ng/mL）、IL-15（30ng/mL）、抗 CD137 激活型抗体（12μg/mL）、抗 CD28 激活型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 LAG-3 封闭型单克隆抗体（5μg/mL）、抗 PD-1 封闭型单克隆抗体（3μg/mL）、达沙替尼（3μM）、5 v/v %人 AB 血清和补至终体积的 X-VIVO 15 基础培养基。

TIL 细胞扩增培养基

（d）IL-2（500U/mL）、IL-7（5ng/mL）、IL-15（10ng/mL）、抗 PD-1 封闭型单克隆抗体（3μg/mL）、抗 CD3 激活型单克隆抗体、抗 CD28 激活型单克隆抗体，5v/v%人 AB 血清和补至终体积的 X-VIVO 15 基础培养基。所述抗 CD3 激活型单克隆抗体和抗 CD28 激活型单克隆抗体包被在培养器皿表面；

（e）IL-2（500U/mL）、IL-7（7ng/mL）、IL-15（30ng/mL）、抗 PD-1 封闭型单克隆抗体（1μg/mL）、抗 CD3 激活型单克隆抗体、抗 CD28 激活型单克隆抗体、抗 CD137 激活型单克隆抗体、5v/v%人 AB 血清和补至终体积的 X-VIVO 15 基础培养基，所述抗 CD3 激活型单克隆抗体、抗 CD137 激活型单克隆抗体和抗 CD28 激活型单克隆抗体包被在培养器皿表面。

实体肿瘤样本处理与表达膜锚定 IL-7 TIL 的制备：

1）配制含有终浓度 100U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 50 μg/mL 庆大霉素的生理盐水待用；

2）在二级生物安全柜中无菌环境下将获得的新鲜分离的肿瘤患者的肿瘤组织样本置于已加入 30 mL 步骤 1）配制的生理盐水的 10cm 培养皿中洗涤，再转移至新的加入 30 mL 步骤 1）配制的生理盐水的 10cm 皿中洗涤，共重复洗 3 次；

3）用无菌手术刀片剔除脂肪组织与坏死组织，将肿瘤组织切割成为直径 3×3×3 mm^3 的小块，取 2 个 G-REX100 培养罐（购自 Wilsonwolf），每个 G-REX100 培养罐中放置 42 块随机选取的肿瘤组织块，培养罐中加入上述配制的 TIL 种子细胞培养基 a、b、c 中的一种作为种子细胞培养基；多余的肿瘤组织块用 CryoStor10（购自 BioLifeSolutions）冻存液通过程序降温仪液氮冻存；

4）将 3）中含有肿瘤组织块的 G-REX100 培养罐中加入 1L TIL 种子细胞培养基后，对肿瘤组织块 37℃ 5%CO_2 进行培养，每隔 4 天移除一半体积的旧种子细胞培养基，补加一半体积的新鲜种子细胞培养基，第 11-15 天离心收获 TIL 种子细胞后统计细胞总数与活率；

5）取 4）中收获的 TIL 种子细胞，根据检测的活率收集包含 1×10^8-2×10^8 活细胞的 TIL 种子细胞群，将实施例 1 制备的表达膜锚定 IL-7 的表达载体通过 Lonza Nucleofector™2b 电转仪电转进核，具体步骤如下：

①预先将实施例 2 配制的培养基 b 加入 G-REX6 的孔中，每孔 40mL，随后转入细胞培养箱内 37℃ 5%CO_2 预热 1 小时；

②按下表进行每孔单次用量的电转液配比：

	100 μL Nucleocuvette™ Strip (μL)
Nucleofector™溶液的体积	82
电转补充溶液	18

③取步骤 5）中收获的 TIL 至 EP 管内，每个 EP 管内加入 1×10^7 个细胞，800g 离心 5min，弃上清，随后用 500 μL 生理盐水重悬细胞，重复离心步骤洗涤细胞沉淀；

④向②中配置好的电转液加入实施例 1 制备的浓度调整为 5 μg/mL 的各表达膜锚定 IL-7 的表达载体 0.6-1 μL（3-5 μg），随后室温静置 30min 以内（此时总体积可以略大于 100 μL）；

⑤用④中配置好的含质粒的电转液重悬 TIL，小心吸取细胞重悬液转入 LONZA 100μL 电转杯内，将电转杯放入 LONZA Nucleofector™ 2b 电转槽内，启动电转程序，电转程序选择 T-020；

⑥电转完成后小心取出电转杯，吸取细胞悬液转移至 EP 管中，每管加入预热的 X-VIVO 15 培养基 200μL，随后转入①中 G-REX6 内含预热实施例 2 培养基 b 的孔中，重复上述电转操作只至 1×10^8-2×10^8 活 TIL 种子细胞全部完成电转，37℃、5%CO_2 培养，隔 2 天移除一半体积的旧种子细胞培养基，补加一半体积的新鲜种子细胞培养基，至细胞活率恢复至 90%以上，准备继续后续操作；

6）取 5）中经过电转的 TIL 种子细胞 800g 离心 5 分钟，用含有除包被组分外的所有其他相应溶液中组分的 TIL 细胞扩大培养基重悬至 1.0×10^5/mL~1.0×10^6/mL，加入到经过包被组分包被预处理的细胞培养器皿中，37℃ 5%CO_2 激活 2-3 天，然后将激活后的细胞离心收集，接种至加入有已事先预热的扩大培养基的 G-REX500M 培养罐中，G-REX500M 培养罐中的扩大培养基同为含有除包被组分外的所有其他相应溶液中组分的扩大培养基。每个 G-REX500M 中扩大培养基体积为 5L。激活后的种子细胞按照 2.0×10^5/cm^2~5.0×10^5/cm^2 的接种密度接种，37℃ 5%CO_2 进行培养，每隔 4 天进行细胞计数后，移除一半体积的旧扩大培养基，补加一半体积的新鲜扩大培养基，待每个 G-REX500M 罐中的细胞总数达到 1.0×10^{10} 后，按 1：2 比例进行分瓶，每瓶补加新鲜扩大培养基至 5L 后继续培养。在 G-REX500M 培养罐的扩大培养基中前后总共培养 10-12 天后收获细胞，获得表达膜锚定 IL-7 的 TIL 产品细胞。

以下表 2 为肿瘤组织样本编号、培养获得的表达膜锚定 IL-7 TIL 的编号、癌种、培养过程中所使用的种子细胞培养基和扩大培养基对应于实施例 2 的编号、每个组织样本种子细胞培养基和扩大培养基各自的培养时长、每个肿瘤组织样本电转所使用的具体载体名称以及 G-REX500M 细胞接种密度；表 3 为步骤 6）中，相应肿瘤组织样本的包被器皿类型、包被激活重悬细胞密度和包被激活时长。

表 2

TIL 编号	肿瘤组织样本编号	癌种	种子细胞培养基编号	种子细胞培养基培养时长（天）	电转使用载体名称	扩大培养基编号	G-REX500M 细胞接种密度（个/cm^2）	扩大培养基培养时长（天）
T001-1	T001	胃癌	a	11	mbIL-7-1	e	2.5×10^5	12
T002-2	T002	黑色素瘤	b	12	mbIL-7-2	d	2.5×10^5	12
T003-2	T003	卵巢癌	b	12	mbIL-7-2	e	2.0×10^5	12

T004-1	T004	宫颈癌	c	12	mbIL-7-1	d	2.5×10^5	12
T005-3	T005	卵巢癌	c	12	mbIL-7-3	e	2.5×10^5	11
T006-5	T006	结肠癌	a	13	mbIL-7-5	d	2.5×10^5	11
T007-6	T007	肺癌	a	12	mbIL-7-6	d	3.0×10^5	12
T008-8	T008	骨肉瘤	b	15	mbIL-7-8	e	2.5×10^5	15
T009-3	T009	宫颈癌复发膀胱转移	c	12	mbIL-7-3	d	2.5×10^5	12
T010-4	T010	卵巢癌复发	a	12	mbIL-7-4	e	4.5×10^5	12
T003-7	T003	卵巢癌	b	12	mbIL-7-7	e	2.0×10^5	12
T011-9	T011	宫颈癌	b	12	mbIL-7-9	d	2.5×10^5	12
T012-9	T012	卵巢癌	b	12	mbIL-7-9	d	2.5×10^5	13
T013-9	T013	宫颈癌	b	12	mbIL-7-9	d	2.5×10^5	12
T014-9	T014	卵巢癌肠系膜转移	b	12	mbIL-7-9	d	2.5×10^5	12

表 3

TIL 编号	肿瘤组织样本编号	癌种	包被器皿种类	激活重悬细胞密度（个/mL）	激活时长（天）
T001-1	T001	胃癌	细胞培养袋	2.0×10^5	2
T002-2	T002	黑色素瘤	细胞培养袋	1.0×10^5	3
T003-2	T003	卵巢癌	细胞培养袋	2.5×10^5	3
T004-1	T004	宫颈癌	245mm细胞培养皿	5.2×10^5	2
T005-3	T005	卵巢癌	细胞培养袋	2.5×10^5	3
T006-5	T006	肠癌	细胞培养袋	2.5×10^5	3
T007-6	T007	肺癌	细胞培养袋	2.5×10^5	3
T008-8	T008	骨肉瘤	细胞培养袋	5.0×10^5	3
T009-3	T009	宫颈癌复发膀胱转移	245mm细胞培养皿	1.0×10^6	3
T010-4	T010	卵巢癌复发	细胞培养袋	2.5×10^5	2
T003-7	T003	卵巢癌	细胞培养袋	2.5×10^5	3
T011-9	T011	宫颈癌	细胞培养袋	2.5×10^5	3
T012-9	T012	卵巢癌	细胞培养袋	2.5×10^5	3
T013-9	T013	宫颈癌	细胞培养袋	2.5×10^5	3
T014-9	T014	卵巢癌	细胞培养袋	2.5×10^5	3

天然 TIL 的制备

按以下步骤制备 T001-T014 肿瘤组织的天然 TIL

1）配制含有终浓度 100U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 50 μg/mL 庆大霉素的生理盐水待用；

2）在二级生物安全柜中无菌环境下将获得的新鲜分离的肿瘤患者的肿瘤组织样

本置于已加入 30 mL 步骤 1）配制的生理盐水的 10cm 培养皿中洗涤，再转移至新的加入 30 mL 步骤 1）配制的生理盐水的 10cm 皿中洗涤，共重复洗 3 次；

3）用无菌手术刀片剔除脂肪组织与坏死组织，将肿瘤组织切割成为直径 3×3×3 mm^3 的小块，取 2 个 G-REX100 培养罐（购自 Wilsonwolf），每个 G-REX100 培养罐中放置 42 块随机选取的肿瘤组织块，培养罐中加入上述配制的 TIL 种子细胞培养基 a、b、c 中的一种作为种子细胞培养基；多余的肿瘤组织块用 CryoStor10（购自 BioLifeSolutions）冻存液通过程序降温仪液氮冻存；

4）将 3）中含有肿瘤组织块的 G-REX100 培养罐中加入 1L TIL 种子细胞培养基后，对肿瘤组织块 37℃ 5%CO_2 进行培养，每隔 4 天移除一半体积的旧种子细胞培养基，补加一半体积的新鲜种子细胞培养基，第 11-15 天离心收获 TIL 种子细胞后统计细胞总数与活率；

5）取 4）中的 TIL 种子细胞 800g 离心 5 分钟，用含有除包被组分外的所有其他相应溶液中组分的 TIL 细胞扩大培养基重悬至 1.0×10^5/mL~1.0×10^6/mL，加入到经过包被组分包被预处理的细胞培养器皿中，37℃ 5%CO_2 激活 2-3 天，然后将激活后的细胞离心收集，接种至加入有已事先预热的扩大培养基的 G-REX500M 培养罐中，G-REX500M 培养罐中的扩大培养基同为含有除包被组分外的所有其他相应溶液中组分的扩大培养基。每个 G-REX500M 中扩大培养基体积为 5L。激活后的种子细胞按照 2.0×10^5/cm^2~5.0×10^5/cm^2 的接种密度接种，37℃ 5%CO_2 进行培养，每隔 4 天进行细胞计数后，移除一半体积的旧扩大培养基，补加一半体积的新鲜扩大培养基，待每个 G-REX500M 罐中的细胞总数达到 1.0×10^{10} 后，按 1：2 比例进行分瓶，每瓶补加新鲜扩大培养基至 5L 后继续培养。在 G-REX500M 培养罐的扩大培养基中前后总共培养 10-12 天后收获细胞，获得天然 TIL 产品细胞。

每个肿瘤组织样本培养过程中所使用的种子细胞培养基和扩大培养基、每个组织样本种子细胞培养基和扩大培养基各自的培养时长、每个肿瘤组织样本的 G-REX500M 细胞接种密度均与表 2 中的相同；步骤 5）中相应肿瘤组织样本的包被器皿类型、包被激活重悬细胞密度和包被激活时长均与表 3 中的相同。

制备获得的各组天然 TIL 分别命名为 T001-TIL、T002-TIL、T003-TIL、T004-TIL、T005-TIL、T006-TIL、T007-TIL、T008-TIL、T009-TIL、T010-TIL、T011-TIL、T012-TIL、T013-TIL、T014-TIL。

实施例 3 表达膜锚定 IL-7 的 TIL 的表型检测

1、细胞存活率与表达膜锚定 IL-7 TIL 的阳性率

通过台盼蓝染色和细胞计数仪计数检测各组细胞存活率。结果显示，实施例 2 制备各组表达膜锚定 IL-7 的 TIL 和天然 TIL 的细胞存活率均在 95%以上。

将上述制备的各表达膜表面 IL-7 的细胞中胞外区包含的 BCMA 胞外结构域作为标签，用流式细胞仪检测外源基因表达阳性的细胞占比，方法如下：

1）收集 T001-1、T002-2、T003-2、T004-1、T005-3、T006-5、T007-6、T008-8、T009-3、T010-4、T003-7、T011-9、T012-9、T013-9、T014-9 各组细胞，每组细胞数量收集 1×10^6 个，800g，离心 3min；取不表达膜锚定 IL-7 的天然 T002-TIL 为对照细胞。

2）弃上清，各加入生理盐水重悬细胞，800g，离心 3min；

3）弃上清，各加入 100μL 生理盐水重悬细胞，每管各加 2μL BCMA 流式抗体（购自 Biolegend 货号：357504），室温孵育 30 分钟；

4）各加入适量生理盐水，800g，离心 3min，洗涤两遍，弃上清；

5）用 400μL 生理盐水重悬，上流式细胞仪检测。

结果显示，各组细胞阳性率如下表 4 所示

表 4

样本名称	阳性率（%）
T001-1	49.31
T002-2	45.43
T003-2	51.22
T004-1	40.19
T005-3	54.07
T006-5	44.68
T007-6	12.35
T008-8	42.46
T009-3	51.95
T010-4	43.77
T003-7	15.07
T011-9	47.6
T012-9	50.1
T013-9	45.9
T014-9	41.1
T002-TIL	0.01

表 4 结果显示，各电转了膜锚定 IL-7 的 TIL 样本以 BCMA 胞外区的表达阳

性作为标准时，除了结构设计中采用了软性接头的 T007-6 和采用了常规的 CD8 跨膜区结构的 T003-7 外，其他样本中的阳性细胞占比均在 40%以上，T003-2、T005-3 和 T009-3 阳性细胞占比超过了 50%。而 T007-6 和 T003-7 的阳性率均低于 20%，显著低于其他样本。其中 T003-2 与 T003-7 相比更具有明显的优势。

以上结果表明：1）作为胞外标签的 BCMA 胞外区或截短 BCMA 胞外区当通过软性接头与跨膜区相连接时，其被抗体识别可能受到影响，不能真实地发挥作为胞外标签的功能；2）与常规跨膜区相比，细胞因子 IL-7 通过 GPI 锚定区锚定在 TIL 表面能够更好地刺激阳性 TIL 的扩增，大大提升阳性 TIL 的占比。

2、淋巴细胞表型及细胞因子分泌水平

取收获的各组表达膜锚定 IL-7 的 TIL 和天然 TIL，用 CD45、CD3、CD4 和 CD8 流式抗体与各组 TIL 孵育，洗涤未结合抗体后上流式细胞仪计数；用 HTRF IFN-γ 检测试剂盒（Cisbio Human IFN gamma kit 货号：62HIFNGPET）根据说明书记载的方法检测 IFN-γ 分泌水平，结果如下表 5 所示：

表 5

TIL 编号	IFN-γ（pg/mL）	CD45+ 细胞比例（%）	$CD3^+$ 细胞占 $CD45^+$ 细胞比例（%）	CD4+ 细胞占 CD45+ 细胞比例（%）	CD8+ 细胞占 CD45+ 细胞比例（%）
T001-1	11025.32	99.55	97.39	39.05	60.51
T002-2	9712.95	99.84	98.94	12.64	82.96
T003-2	10258.25	100	96.95	46.97	50.84
T004-1	10412.15	99.87	99.70	38.71	60.87
T005-3	11069.89	98.97	80.98	32.48	62.87
T006-5	10098.47	100	99.23	43.99	53.33
T007-6	8915.88	100	97.36	45.73	48.38
T008-8	10730.76	100	99.43	45.21	54.23
T009-3	10213.74	99.99	99.25	32.59	50.65
T010-4	9998.82	99.99	92.59	39.09	49.77
T003-7	8988.05	100	98.90	45.11	51.45
T011-9	10719.35	100	99.57	50.25	45.65
T012-9	9853.9	99.53	95.88	44.15	49.88
T013-9	9484.91	100	99.34	48.99	47.43
T014-9	11291.71	98.94	99.09	46.76	50.24
T001-TIL	9892.43	100	93.64	50.42	45.08
T002-TIL	10922.79	100	94.25	39.36	55.67
T003-TIL	10103.18	99.95	99.76	32.34	52.31
T004-TIL	12372.01	99.25	99.34	31.23	64.78

T005-TIL	9624.49	100	94.06	40.09	49.97
T006-TIL	13169.76	98.38	99.61	46.94	49.35
T007-TIL	11279.83	100	98.43	48.27	47.67
T008-TIL	12433.24	100	99.16	29.73	65.93
T009-TIL	9669.69	97.64	99.72	38.79	60.17
T010-TIL	9798.61	100	98.90	29.69	62.31
T011-TIL	12488.26	99.22	98.88	42.06	51.24
T012-TIL	11959.74	98.61	93.29	32.58	62.88
T013-TIL	11813.74	100	96.52	47.14	50.61
T014-TIL	13270.95	100	99.43	35.71	61.43

实施例 4 表达膜锚定 IL-7 TIL 的体外肿瘤细胞杀伤功能

1、黑色素瘤组织来源的原代肿瘤细胞的培养

取 T002 黑色素瘤的肿瘤组织，切割成为 3×3×3mm 大小的碎块，碎块尽量均匀混合后按照 Robert Suriano et al. Ex Vivo Derived Primary Melanoma Cells: Implications for Immunotherapeutic Vaccines J Cancer 2013; 4(5):371-382.中材料和方法（Materials and Methods）部分记载的方法培养获得原代黑色素瘤细胞。

2、表达膜锚定 IL-7 的 TIL 体外对靶细胞杀伤功能的提升

应用安捷伦（Agilent）公司的实时无标记细胞功能分析仪（RTCA）检测实施例 2 获得的 T002-2 和 T002-TIL 对其同源的黑色素瘤原代细胞的体外杀伤活性，具体步骤如下：

(1)调零：每孔加入 50μL DMEM 培养液，放入仪器中，选择步骤 1，调零；

(2)靶细胞铺板：将 1 中培养获得的黑色素瘤原代细胞按每孔 10^4 个细胞/50μL 铺在含有检测电极的板中，放置数分钟，待细胞稳定后，再放入仪器中，开始步骤 2，培养细胞；

(3)加入效应细胞：靶细胞培养 18h-24h 后，观察细胞指数，当细胞指数为 2 时，分别加入效应细胞 T002-2 和 T002-TIL，每孔 50μL，效应细胞按活细胞计数，效靶比设置为 4:1，开始步骤 3，共培养 60h 后，观察细胞增殖曲线。

结果如图 1 显示，与未加入效应细胞的肿瘤细胞组相比，T002-TIL 与 T002-2 对同源的黑色素瘤细胞都有明显的杀伤效果，而表达膜锚定 IL-7 的 T002-2 与不表达外源基因的 T002-TIL 相比对靶细胞的杀伤有了更大幅度的提升，表明膜锚定 IL-7 能显著提升 TIL 对其识别的肿瘤细胞的杀伤能力。

实施例 5 表达膜锚定 IL-7 的 TIL 的体外分子刹车功能检测

抗体合成

委托商业化合成 BCMA 抗体，抗体重链序列为中国专利 CN103562225B 的 SEQ ID NO:29，轻链序列为该专利的 SEQ ID NO:31，该专利通过引用全文纳入本申请。

抗体依赖细胞毒性（ADCC）测定

使用 NK 细胞培养试剂盒（购自同立海源 货号 AS-01）按照说明书方法从健康志愿者血液中培养扩增获得 NK 细胞。将实施例 2 制备得到的 T001-1、T002-2、T003-2、T004-1、T005-3、T006-5、T007-6、T008-8、T009-3、T010-4、T003-7、T011-9、T012-9、T013-9 和 T014-9 作为靶细胞以 AIM-V 培养基重悬，取 T002-TIL 和 T011-TIL 作为负对照靶细胞作相同处理。按 1.0×10^4 细胞/孔/50μL 加入 96 孔板的孔。同时将前述合成的 BCMA 抗体也用 AIM-V 重悬至终浓度为 500 μg/mL 后，取 10μL 加入 96 孔板孔中，与孔中靶细胞预先室温孵育 40 分钟。作为效应细胞的 NK 细胞用含有 2%FCS AIM-V 培养基重悬至 2.5×10^6 /mL，在靶细胞与 BCMA 抗体 40 分钟孵育结束后取 40μL 上述 NK 细胞悬液加入靶细胞与 BCMA 抗体混合液，使效靶比达到 10：1，同时体系中的 BCMA 抗体终浓度为 50 μg/mL，体系总体积为 100μL。将该体系轻轻吹打混匀，孔板置于 5%CO_2 37℃培养箱内孵育 3 小时。应用 LDH 乳酸脱氢酶-细胞毒性检测分析试剂盒(LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit，Biovision，货号 K313-500)评价 BCMA 抗体对上述各靶细胞的抗体依赖细胞毒性（ADCC）效果。

补体依赖细胞毒性（CDC）测定

将实施例 2 制备得到的 T001-1、T002-2、T003-2、T004-1、T005-3、T006-5、T007-6、T008-8、T009-3、T010-4、T003-7、T011-9、T012-9、T013-9、T011-9、T012-9、T013-9 和 T014-9 作为靶细胞以 AIM-V 培养基重悬，取 T002-TIL 和 T011-TIL 作为负对照靶细胞作相同处理。按 1.0×10^4 细胞/孔/50μL 加入 96 孔板的孔。同时将前述合成的 BCMA 抗体也用 AIM-V 重悬至终浓度为 500 μg/mL 后，取 10μL 加入 96 孔板孔中，与孔中靶细胞预先室温孵育 40 分钟。新鲜化冻正常人血清补体（Normal Human Serum Complement，Quidel，货号 A112），用 AIM-V 培养基稀释 3 倍。在靶细胞与 BCMA 抗体 40 分钟孵育结束后，向其中加入稀

释的人血清补体 40μL，使 BCMA 抗体终浓度为 50 μ g/mL，体系总体积为 100μL。将该体系轻轻吹打混匀，孔板置于 5%CO_2 37℃培养箱内孵育 3 小时。应用 LDH 乳酸脱氢酶-细胞毒性检测分析试剂盒(LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit，Biovision，货号 K313-500)评价补体对上述各靶细胞的补体依赖细胞毒性（CDC）效果。根据 LDH 乳酸脱氢酶-细胞毒性检测分析试剂盒说明书，细胞毒性计算公式如下：

$$细胞毒性（\%）=\frac{测试样本-低对照值}{高对照值-低对照值}\times 100$$

其中低对照值为细胞完全不作裂解处理的条件下上清中 LDH 含量对应的吸光度值，高对照值为对细胞进行彻底裂解处理的条件下上清的吸光度值。

ADCC 与 CDC 结果如表 6 所示，在加入 BCMA 抗体后，除 T007-6 与 T003-7 外，其他各表达膜表面 IL-7 的细胞样本都可见非常明显的 ADCC 与 CDC 毒性，与实施例 3 表 4 中阳性率检测结果一致。而不表达膜表面 IL-7 的天然 TIL（T002-TIL 和 T011-TIL）未见明显 ADCC 与 CDC 毒性。胞外结构中含有软性接头的 T007-6 的 ADCC 和 CDC 毒性较其他样本明显较低，表明 BCMA 抗体加入后未能充分介导 ADCC 与 CDC 效应的发生。表明当 BCMA 胞外区通过软性接头与跨膜区连接时，其表位结构可能受到影响，致使 BCMA 抗体与之无法正常结合。

表 6

TIL 编号	ADCC 细胞毒性（%）	CDC 细胞毒性（%）
T001-1	42.93	44.08
T002-2	41.85	39.58
T003-2	49.03	45.12
T004-1	37.51	35.33
T005-3	50.72	48.15
T006-5	40.35	41.03
T007-6	10.23	9.89
T008-8	40.06	38.38
T009-3	49.19	49.71
T010-4	42.21	40.77
T003-7	12.47	11.68
T011-9	45.03	41.55
T012-9	45.41	47.45
T013-9	43.83	41.92
T014-9	39.43	38.43
T002-TIL	0.09	0.13
T011-TIL	0.03	0.11

实施例 6 表达膜锚定 IL-7 TIL 的 CDX 模型体内肿瘤杀伤功能

实验细胞的构建

构建膜表面稳定表达人 CD3 抗体（OKT3）的 SKOV-3 细胞株 SKOV-3 320 作为卵巢癌靶细胞，具体如下：

1、表达膜表面 CD3 抗体的慢病毒载体构建

编码膜表面 CD3 抗体（αCD3TM）的结构包括 CD8 信号肽、CD3 scFv、接头和 CD8 跨膜区，其氨基酸序列 SEQ ID NO:49 所示，DNA 序列如 SEQ ID NO:50 所示。委托合成包括 SEQ ID NO:50 在内的 5’和 3’分别包含 PmeI 和 MluI 限制性酶切位点的 DNA 序列，酶切后链接到慢病毒载体 pWPXL-EGFP 表达质粒（购自 addgene）获得 pWPXL-αCD3TM -EGFP；委托合成编码 EGFP、P2A 接头和嘌呤霉素抗性基因（puro）融合蛋白（EGFP-puro）的 DNA 序列，5’和 3’分别包含 MluI 和 SpeI 酶切位点，酶切后连接到 pWPXL-αCD3TM –EGFP，获得 pWPXL-αCD3TM –EGFP-puro 慢病毒表达质粒。

2、慢病毒制备

以下包装质粒 psPAX2 和 pMD2.G 均购自 addgene。

1）转染前一天 293T 细胞进行传代，以 35%的细胞汇合度接种到 6 孔板；

2）第二天转染前 1h 将 6 孔板里的培养基吸掉，再每孔缓慢加入 2mL Opti-MEM™（购自 ThermoFisher）培养基；

3）质粒转染液配制：

a) Lipofectamine™3000（购自 ThermoFisher）稀释：750μL Opti-MEM™ 中加入 24μL 的 Lipofectamine™ 3000，充分混匀；

b) DNA 稀释：质粒加入比例为 pWPXL-αCD3TM–EGFP-puro：pSPAX2：pMD2.G=4:3:1，三个质粒每孔加入总量为 2.5μg，即三个质粒 6 个孔的加入量分别为 7.5μg、5.625μg、1.875μg，750μL Opti-MEM™中加入相应体积的质粒和 30 μL 的 P3000™（购自 ThermoFisher），充分混匀；

c) 将 DNA 稀释液加入到 Lipofectamine™ 3000 稀释液，混匀；

4）室温孵育 13 分钟后，每孔滴入 250μL 的 DNA-脂质复合物；

5）6h 后将 6 孔板里的培养基吸掉，每孔加入 2mL 的完全培养基（H-

DMEM+10v/v%FBS，均购自 ThermoFisher）；

6）细胞转染 48h 后将细胞上清液全部收集到 15mL 离心管中，1500 rpm 离心 10min，再用 0.22μM 滤膜过滤，然后分装到 1.5mL EP 管中（1.5mL/管），放置-80℃冰箱冻存。

3、慢病毒感染目的细胞

目的细胞为整合表达荧光素酶（luciferase）基因的卵巢癌细胞株 SKOV3-Luc，购自 BPS Bioscience（Cat#78425）

1）感染前一天将 SKOV3-Luc 进行传代，以 20%的汇合度接种到 6 孔板中的 2 个孔里；

2）感染当天从-80℃冰箱取出 1 管病毒液，室温融化；

3）吸掉其中 1 个孔里的培养基，加入 1.5mL 新鲜的完全培养基（IMDM+15v/v%FBS+1×非必须氨基酸 NEAA，IMDM、FBS 购自 ThermoFisher，100×非必须氨基酸购自 cyagen）和 1.5mL 的病毒液，再加入聚凝胺至终浓度为 8μg/mL，晃匀后放置 37℃二氧化碳培养箱，另外 1 个孔不做处理。

4、阳性混合克隆稳转细胞株筛选

1）慢病毒感染第三天，2 个孔里的细胞汇合度都达到 90%以上；

2）弃去培养基，每孔加入 3mL 新鲜完全培养基，再加入嘌呤霉素至终浓度为 3μg/mL；

3）加入嘌呤霉素培养 48h 后，病毒未感染的对照细胞死亡接近 100%，感染孔的细胞汇合度达到 90%，将感染细胞全部转移到 T25 培养瓶中继续添加嘌呤霉素至终浓度为 3 μ g/mL 培养；

4）待细胞增殖时长稳定后，进行扩增并冻存保种，并做阳性率流式检测，最终获得的混合克隆稳转细胞株，命名为 SKOV3-αCD3TM-EGFP；

5）用 xCELLigence RTCA TP 实时无标记细胞分析仪（Agilent）对宿主细胞 SKOV3-Luc 和混合克隆稳转细胞株 SKOV3-αCD3TM-EGFP 进行细胞杀伤功能检测，使用健康人外周血 PBMC 来源的 T 细胞作为效应细胞。结果显示：相较于未经改造的 SKOV3-Luc，T 细胞对 SKOV3-αCD3TM-EGFP 表现出明显更强的杀伤能力。

5、单克隆细胞株筛选

1）将配制的完全培养基（IMDM+15v/v%FBS+1×NEAA）进行用 0.22μM 滤膜过滤，减少试剂中杂质影响接下来的单细胞显微镜观察；

2）混合克隆稳转细胞株 SKOV3-αCD3TM-EGFP 进行细胞计数；

3）按照铺板密度为 0.8 个细胞/孔，铺 2 块 96 孔细胞培养板：用 8 通道移液器（最大量程为 50μL）加入 100μL 培养基/孔，再加入 50μL 细胞悬液/孔（16 个细胞/mL，制备 15mL），接着 96 孔板的 A1 孔加入 1000 个细胞；

4）37℃二氧化碳培养箱静置培养 6h 后进行细胞显微镜观察，对含有单个细胞的孔进行拍照记录；

5）含有单个细胞的孔于第 1 天、第 2 天、第 3 天进行拍照捕捉细胞分裂过程；

6）对标记的单细胞克隆进行换液，每孔吸掉 100μL 的培养基，再补加 150μL 的新鲜培养基，之后每隔 3 天换次培养基；

7）待孔里的单细胞克隆汇合度达到 50%以上进行转移，按照 96 孔板到 24 孔板，再到 6 孔板，再到 T25 培养瓶，最后到 T75 培养瓶依次扩大培养；

8）扩增起来的单克隆细胞进行流式检测阳性率表达，同时冻存保种；

9）用 xCELLigence RTCA TP 实时无标记细胞分析仪对不同单克隆细胞株进行细胞杀伤功能检测，杀伤结果显示：编号 320 的单克隆细胞株能较好地响应 T 细胞杀伤，并且在起始一段时间细胞杀伤存在细胞数量依赖关系，随着效靶比增加，杀伤力增强，命名为 SKOV-3 320，作为后续实验肿瘤靶细胞。

效应细胞：选用以卵巢癌组织 T014 为来源培养的表达膜锚定 IL-7 的 TIL T014-9 作为效应细胞。

实验动物

选用免疫缺陷 B-NDG 小鼠（购自百奥赛图）作为 CDX 模型构建实验动物。

实验设计和分组：如下表 7 所示

表 7 小鼠给药方案及分组

组别	药物	动物数	给药途径	给药频次	给药体积(μL)	时间（天）
1	PBS	6	尾静脉	单次	200	65
2	T014-9 (0.5×10^7 /只)	6	尾静脉	单次	200	65

3	T014-9 (1.5×10^7 /只)	6	尾静脉	单次	200	65

TIL 细胞为实施例 2 制备的来源于组织样本 T014 的表达膜锚定 IL-7 的 TIL 产品细胞 T014-9，尾静脉注射给药前将细胞离心重悬于 PBS，对组别 2 制成细胞密度为 2.5×10^7/mL 的细胞悬液，对组别 3 制成细胞密度为 7.5×10^7/mL 的细胞悬液。

动物饲养

采购所需用量的 B-NDG 小鼠后，饲养于 SPF 级实验动物房，适应期 7-10 天。

环境：小鼠将被安置于动物房的透明树脂塑料笼中。鼠笼垫料为经高压灭菌的木屑和玉米芯垫料，定期更换。动物房间配备高效空气过滤器，温度将保持在 20-26℃ （68-79° F） 之间，相对湿度为 40-70%。持续观测并记录温度和湿度。照明条件为每天 12 小时日光灯照射和 12 小时无照明。

食物和饮水：实验用小鼠可无限量获取专用鼠粮 （经辐照消毒，上海斯莱克实验动物责任有限公司，中国），可无障碍在任何时间接近灭菌的洁净饮水。

皮下异位肿瘤模型建立

SKOV-3 320细胞计数后用于肿瘤接种。每只小鼠在右侧腋下皮下接种0.2mL含 50% 基质胶的肿瘤细胞液（1E7/只），接种当天定为 D0。

动物分组及给药

肿瘤平均体积达到 100mm^3 时，从 36 只动物中挑选 24 只动物按肿瘤体积（均值 111mm^3）进行随机分组，确保所有组在基线上具有可比性。分组当天记为 P0。实验期间每周 3 次测定动物体重和肿瘤体积，每日进行观察动物的临床症状。肿瘤体积用 mm^3 表示，公式为:$V = 0.5\times a\times b^2$，其中 a 和 b 分别为肿瘤的长径和短径。首次给药后 7 周和实验终点，使用小动物活体成像系统，测定肿瘤荧光值。

活体成像

实验结束当天，用 IVIS Lumina XR （Perkin Elmer）检测小鼠的生物发光信号。动物先腹腔注射 150 mg/kg 荧光素钠，用异氟烷麻醉。动物注射荧光素钠 10 分钟后采集生物发光图像，曝光时间为 60 秒。使用 Living Image 软件将图像量化为光子/秒。

结果

实验结果如图 2 和图 3 所示。图 2 显示组间肿瘤体积大小差异，不同组别间肿瘤体积大小差异进行单向方差分析（one-way ANOVA analysis），随后采用 Bonferroni 法进行事后检验（Bonferroni post hoc test），观察不同组别两两间是否有显著差异。*：p<0.05; **:p<0.01； ***:p<0.001。图 3 显示实验结束当天对各组实验小鼠荧光活体成像结果。图 2 显示的结果表明，与 PBS 组相比，0.5×10^7/只 T014-9 回输剂量组中小鼠肿瘤的体积显著更小；而 1.5×10^7/只 TIL 回输剂量组中小鼠的肿瘤到 D65 已经完全消失。图 3 显示，在 D65，1.5×10^7/只的 T014-9 回输剂量组中已经完全观察不到肿瘤细胞荧光。以上结果表明，T014-9 细胞对卵巢癌 CDX 组织在小鼠体内具有非常显著的杀伤效果。

实施例 7 表达膜锚定 IL-7 TIL 的 PDX 模型体内肿瘤杀伤功能

选用 T011 宫颈癌肿瘤组织构建免疫缺陷小鼠 PDX 肿瘤模型，用模型鼠进行 TIL-PDX 动物体内肿瘤杀伤效果检测，选用免疫缺陷 B-NDG 小鼠（购自百奥赛图）作为 PDX 模型实验动物。

实验设计和分组：如下表 8 所示

表 8 小鼠给药方案及分组

组别	药物	动物数	给药途径	给药频次	给药体积 (μL)	时间 （天）
1	PBS	8	尾静脉	单次	200	30~42
2	T011-TIL (2×10^7 /只)	8	尾静脉	单次	200	30~42
3	T011-9 (2×10^7/只)	8	尾静脉	单次	200	30~42

TIL 细胞为实施例 2 制备的来源于组织样本 T011 的 TIL 产品细胞，尾静脉注射给药前将细胞离心重悬于 PBS，制成细胞密度为 1×10^8/mL PBS 细胞悬液。

动物饲养

采购所需用量的 B-NDG 小鼠后，饲养于 SPF 级实验动物房，适应期 7-10 天。

环境：小鼠将被安置于动物房的透明树脂塑料笼中。鼠笼垫料为经高压灭菌的木屑和玉米芯垫料，定期更换。动物房间配备高效空气过滤器，温度将保持在 20-26℃ （68-79° F） 之间，相对湿度为 40-70%。持续观测并记录温度和湿度。照明条件为每天 12 小时日光灯照射和 12 小时无照明。

食物和饮水：实验用小鼠可无限量获取专用鼠粮 （经辐照消毒，上海斯莱克实验动物责任有限公司，中国），可无障碍在任何时间接近灭菌的洁净饮水。

PDX 模型的构建

1）患者肿瘤组织样本处理：取 T011 肿瘤组织一部分，无菌条件下剔除坏死部分组织、脂肪组织、结缔组织等，冲洗干净后用手术刀分割成若干 5×5×5mm^3 组织块，置于含肿瘤样本运输保存液 UW 中，准备用瘤块接种 B-NDG 小鼠；

2）肿瘤组织样本接种：取若干 B-NDG 小鼠，小鼠肩胛部备皮后用小鼠皮下肿瘤接种固定器固定小鼠，碘伏消毒，利多卡因局麻后用 PDX 模型瘤块接种套管针将 1）中瘤块接种至右侧腹股沟部。接种当天记为 P0，每周量瘤 2 次，肿瘤体积计算公式为:$V = 0.5 \times a \times b^2$，其中 a 和 b 分别为肿瘤的长径和短径；

3）PDX 组织传代：观察各接种小鼠肿瘤组织生长情况，等到有肿瘤组织体积长到超过 300mm^3 后，麻醉小鼠，取出瘤块，无菌条件下手术刀切割成 5×5×5mm^3 组织块后重复步骤 2），接种到新的小鼠右侧腹股沟部，等待 PDX 肿瘤的下一代生长；

4）重复步骤 3），继续传代 2-3 代后，取部分小鼠体内 PDX 组织进行组织切片病理分析，确定 PDX 组织仍然为人源组织（而非鼠源组织）后，按表 8 的实验计划中使用的小鼠数量的 1.5 倍继续用 PDX 组织接种小鼠（即 PDX 组织块接种 36 只鼠），观察小鼠成瘤情况，每周量瘤 2 次，等待成瘤。

动物分组及给药

等 PDX 接种小鼠的肿瘤体积达到~50mm^3 左右时，从 36 只动物中选取 24 只肿瘤体积合适的动物，按肿瘤体积进行随机分组，n=8，确保所有组在基线上具有可比性。分组当天记为 D0，按表 8 方案进行给药。实验期间每周 3 次测定动物体重和肿瘤体积，每日进行观察动物的临床症状。肿瘤体积用 mm^3 表示，肿瘤测量公式同上述。

结果如图 4 所示。不同组别间肿瘤体积大小差异进行单向方差分析（one-way ANOVA analysis），随后采用 Bonferroni 法进行事后检验（Bonferroni post hoc test），观察不同组别两两间是否有显著差异。*：$p<0.05$; **:$p<0.01$；***:$p<0.001$。实验结果表明，截止到给药后第 40 天，与注射 PBS 对照组荷瘤小鼠相比，T011-TIL 组的小鼠肿瘤体积增长受到了非常显著的抑制，而 T011-9 与 T011-TIL 组相比对肿瘤体积增长的抑制更加显著，表明 T011 来源的天然 TIL 产品细胞对与其来源患者相同的肿瘤 PDX 组织在体内具有非常明显的杀伤效果，而对天然 TIL

进行膜锚定 IL-7 修饰后能够进一步提升这一效果。

实施例 8 表达膜锚定 IL-7 TIL 的临床回输

为了验证本申请表达膜锚定 IL-7 TIL 在临床上的安全性与有效性，开展了针对实体肿瘤的 TIL 回输治疗临床试验。本项临床试验已获得上海市第十人民医院伦理委员会批准通过，具体参见 www.clinicaltrials.gov，注册号：NCT05468307。

研究方案

1、受试者纳入、排除标准和分配入组方法

纳入标准：

1）18 岁≤年龄≤75 岁；

2）经病理诊断为原发/复发/转移的妇科肿瘤患者；

3）预期寿命>3 个月；

4）Karnofsky≥60%或 ECOG 评分 0—2 分；

5）受试者目前经标准治疗失败，或无标准治疗方案；

6）受试者必须具有适用于穿刺或切除活组织的肿瘤区域或恶性积液可分离出 TILs；

7）至少有 1 个可评估的肿瘤病灶；

8）血液学与生化指标（入组前 7 天内）

白细胞绝对计数≥2.5×10^9/L；

中性粒细胞绝对计数≥1.5×10^9/ L；

淋巴细胞绝对计数≥0.7×10^9/ L；

血小板计数≥100×10^9；

血红蛋白≥90 g/L；

活化部分凝血活酶时间（APTT）≤1.5×ULN（在前 3 天内接受过抗凝血治疗除外）；

国际标准化比值（INR）≤1.5×ULN（在前 3 天内接受过抗凝血治疗除外）；

血清肌酐≤1.5mg/dL（或≤132.6μmol/L），或血清肌酐清除率≥50 mL/min；

血清 ALT（谷丙转氨酶）/ AST（谷草转氨酶）≤3×ULN（肝转移受试者

≤3×ULN）

总胆红素≤1.5×ULN；

9）无手术或穿刺术绝对或相对禁忌证；

10）具有生育潜力的受试者必须愿意在知情同意时开始实施经批准的高效避孕方法，并在淋巴清除方案完成后 1 年内持续实施；

11）任何针对恶性肿瘤的治疗方法，包括放疗、化疗及生物制剂，必须在取得 TILs 的 28 天前停止；

12）有足够的理解能力和自愿签署知情同意书；

13）能够坚持随访计划和其他协议要求。

排除标准：

1) 需要使用糖皮质激素治疗，每天剂量大于 15 毫克的泼尼松（或相当剂量的激素）或自身免疫性疾病需要免疫抑制治疗；

2) 1 秒用力呼气容积（FEV1）的<2 L，肺一氧化碳弥散量（DLCO）（校正）＜40%；

3）显著的心血管异常的下列任何一个定义：纽约心脏协会（NYHA）分级 III 或 IV 级充血性心脏衰竭，临床上显著的低血压，临床无法控制的高血压，不能控制的症状性冠状动脉疾病，或射血分数＜35%； 严重的心脏节律及传导异常，如需要临床干预的室性心律失常、II-III 度房室传导阻滞等；

4）患者有人类免疫缺陷病毒（HIV）感染或 HIV 抗体检测阳性，活跃的乙型肝炎或丙型肝炎病毒感染（HBsAg 阳性和/或抗-HCV 阳性），梅毒感染或梅毒螺旋体抗体阳性；

5）严重的躯体或精神疾病；

6）具有需要治疗的全身性的活跃的感染，或血液培养阳性（或感染的影像学证据）；

7）1 个月内或正在接受其他药物，或其他的生物、化疗或放射治疗；

8）有由于和细胞治疗相似的化学或生物组成的化合物的过敏反应史；

9）曾接受免疫治疗并出现 irAE 等级≥3 级；

10）既往抗肿瘤治疗的不良反应尚未恢复到 CTCAE5.0 版本等级评价≤1 级（脱发等研究者判断无安全风险的毒性除外）；

11）妊娠期或哺乳期女性；

12）器官移植、异体干细胞移植及换肾治疗史；

13）研究者认为受试者存在其他严重的系统性疾病史，或其他原因不适合参加本临床研究。

2、疗效评定标准

主要疗效指标：

1）客观缓解率（ORR）；

2）疾病控制率（DCR）；

3）缓解持续时间（DOR）；

4）无进展生存期（PFS）；

5）总生存期（OS）。

次要疗效指标：

1）临床疗效评价：完全缓解（CR）、部分缓解（PR）、疾病控制（SD）、疾病进展（PD）等；

2）治疗前后的生活质量变化。

疗效定义为研究者可以观察到的 ORR，其按照 RECIST v1.1 的标准。

3、不良事件的记录以及处理措施

3.1 不良事件的定义

不良事件(AE)：自受试者签署知情同意书并入选试验开始，至最后一次医学随访之间出现的不良医学事件，可以表现为症状体征、疾病或实验室检查异常，但并不一定与治疗或试验药物有因果关系。

新的状况或原有状况的恶化视为 AE。入选研究前原有的，并且在研究期间没有恶化的稳定慢性疾病，例如关节炎不视为 AE。异常实验室检查结果、临床症状或体征经由研究者判断具有临床意义则视为 AE。

严重不良事件（SAE）：指试验过程中出现的满足以下情形中一条或多条的不良事件：（1）导致死亡；（2）危及生命，指严重病人即刻存在死亡的风险，并非是指假设将来发展严重时可能出现死亡；(3)导致住院或住院时间延长；(4)

永久或显著的功能丧失；（5）致畸、致出生缺陷；（6）其他重要医学事件。

3.2、不良事件严重程度判定标准

研究过程中发生的所有不良事件严重程度根据 NCI-CTCAE 5.0 版进行评价，分为 1 至 5 级：

1 级：轻度；无症状或轻微；仅为临床或诊断所见；无需治疗。

2 级：中度；需要较小、局部或非侵入性治疗；与年龄相当的工具性日常生活活动受限。

3 级：严重或医学上有重要意义但不会立即危及生命；导致住院或者延长住院时间；致残；个人日常生活活动受限。

4 级：危及生命；需要紧急治疗。

5 级：与 AE 相关的死亡。

4、回输前预处理

在进行 TIL 细胞回输前，患者接受淋巴细胞预处理方案(羟氯喹 600-800mg×1 天，环磷酰胺 20-25 mg/kg/d×3 天)，预处理方案使用的药物、剂量、天数（给药频次），研究者会根据患者的实际情况进行判断调整。

定义回输当天为第 0 天。TIL 细胞回输前，研究者需对患者进行如下化疗预处理（预处理后患者会出现白细胞减少，需要注意预防感染，如避免病房不必要的人员流动，患者佩戴口罩等）：

-5 天静脉注射环磷酰胺（Cy）20-25mg/kg＋ 口服羟氯喹（HCQ） 600-800mg

-4 天静脉注射环磷酰胺 20-25mg/kg

-3 天静脉注射环磷酰胺 20-25mg/kg

-2、-1 天患者休息

0 天进行 TIL 细胞回输。

5、TIL 回输及疗效评估

在前述 4 回输前预处理完成后的第 0 天对患者进行回输，每位患者均进行单次回输，一次回输剂量为 1.0×10^9-5.0×10^9 个 TIL 细胞，回输的细胞制剂的细胞密度为 1.0×10^7/mL-5.0×10^7/mL，回输的细胞制剂的体积为 100mL。患者在第 0 天

进行 TIL 细胞回输，回输后不施用任何细胞因子。回输后患者需要在院观察 5-8 天，观测并记录回输后患者的状况。在患者知情同意的前提下不同时间点抽取患者外周血检测 PBMC 的组成及变化，回输后 1-6 个月进行 MRI 影像学效果评估。

6、**TIL 临床回输结果**

参与回输的部分受试者的临床回输综合信息和疗效评估结果如下表 9 和表 10 所示（评估时间在回输后 1-6 个月内不等）。

表 9 患者 TIL 临床回输综合信息

编号	肿瘤类型	回输TIL细胞量	回输前预处理	临床疗效
T011	宫颈癌	1.52×10^{10}	Cy 20mg/kg+ HCQ 600mg	CR
T012	卵巢癌	1.67×10^{9}	Cy 25mg/kg+ HCQ 600mg	CR
T013	宫颈癌（肝肺转移）	4.97×10^{9}	Cy 25mg/kg+ HCQ 600mg	PR
T014	卵巢癌（肠系膜转移）	2.89×10^{9}	Cy 20mg/kg+ HCQ 800mg	原发病灶CR，整体PR

T011 患者在回输前肿瘤直径 2.2cm，回输后 14 周肿瘤病灶通过核磁成像已检测不到，判定为完全缓解（CR），如图 5 所示。

T012 患者在回输前肿瘤直径 4.5cm，回输后 22 周肿瘤病灶通过核磁成像已检测不到，判定为部分缓解（CR），如图 6 所示。

T013 患者在回输前肿瘤直径 2.1cm，回输后 13 周肿瘤病灶通过核磁成像检测发现明显缩小，判定为部分缓解（PR），如图 7 所示。

T014 患者回输前肿瘤直径为 2.6cm×2.5cm，回输 24 周原发病灶肿瘤通过核磁成像已经检测不到，原发病灶判定为完全缓解（CR），综合判定为部分缓解（PR），如图 8 所示。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人 员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

本文部分序列

mbIL-7-1
SEQ ID NO:31
MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFL
FRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL
LQEIKTCWNKILMGTKEHAEAAAKEAAAKAMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNS
VKGTNAGQNDTSQTSSPSASSNISGGIFLFFVANAIIHLFCFS
mbIL-7-2
SEQ ID NO:33
MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFL
FRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL
LQEIKTCWNKILMGTKEH
RADAAPTVSMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAGQNDTSQTSSPSASSN
ISGGIFLFFVANAIIHLFCFS
mbIL-7-3
SEQ ID NO:35
MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFL
FRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL
LQEIKTCWNKILMGTKEHRTVAAPSVFMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCDLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKG
TNAGQNDTSQTSSPSASSNISGGIFLFFVANAIIHLFCFS
mbIL-7-4
SEQ ID NO:37
MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFL
FRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL
LQEIKTCWNKILMGTKEHPSPLFPGPSKPMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCDLRCSSNTPPLTCQRYCNAFVPVFLPA
KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDGQNDTSQTSSPSASSNISGGIFLFFVANAIIHLFCF
S
mbIL-7-5
SEQ ID NO:39
MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFL
FRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL
LQEIKTCWNKILMGTKEHMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCDLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNARTVAAP
SVFGQNDTSQTSSPSASSNISGGIFLFFVANAIIHLFCFS
mbIL-7-6
SEQ ID NO:41
MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFL
FRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL
LQEIKTCWNKILMGTKEHGGGGSGGGGMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKG
TNAGQNDTSQTSSPSASSNISGGIFLFFVANAIIHLFCFS
mbIL-7-7
SEQ ID NO:43
MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFL
FRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL
LQEIKTCWNKILMGTKEHRADAAPTVSMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKG
TNAIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
mbIL-7-8
SEQ ID NO:45
MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMF
LFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKR
LLQEIKTCWNKILMGTKEHRADAAPTVSMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNAGQNDTSQ
TSSPSASSNISGGIFLFFVANAIIHLFCFS
mbIL-7-9
SEQ ID NO:47
MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFL
FRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL
LQEIKTCWNKILMGTKEHPSPLFPGPSKPMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCDLRCSSNTPPLTCQRYCNAGQNDTSQ
TSSPSASSNISGGIFLFFVANAIIHLFCFS
膜表面 CD3 scFv
SEQ ID NO:49
MALPVTALLLPLALLLHAARP
QVQLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSS
TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAIMSASPGEKVT
MTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFG
SGTKLEINRRADAAPTVSIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

权 利 要 求 书

1、一种修饰的 TIL，其表达膜锚定 IL-7，

优选地，所述膜锚定 IL-7 包括 IL-7 或其功能片段和跨膜区。

2、如权利要求 1 所述的修饰的 TIL，其特征在于，

所述跨膜区为蛋白跨膜结构域；优选地，所述蛋白跨膜结构域包括选自 CD8 跨膜区、CD28 跨膜区和 IL-7Rα 跨膜区中的任一种，或者

所述跨膜区为 GPI 锚定区；优选地，所述 GPI 锚定区包括选自以下的一种或多种 GPI 膜锚定蛋白的膜锚定区：CD44、CD56、CD73、CD55、Thy1、AchE、IAP、ALPP、CD59、CD14、CD16、CD24、CD28、CD48、CD52、CD58、CD66a、CD66c、CD66d、CD66e、CD67、CD87、CD108、CD157、uPAR、JMH 蛋白、GDNFR、CNTFR、TAG-1、PrP、磷脂酰肌醇蛋白、信号素 7、CEA、GFR、Ly6G、转铁蛋白受体、接触素（F3）和 T-钙黏蛋白。

3、如权利要求 1 所述的修饰的 TIL，其特征在于，所述膜锚定 IL-7 还包括膜表面标签，

优选地，所述膜表面标签包括 B 细胞表面抗原的胞外结构域或其保留有与抗体结合功能的变体，

更优选地，所述膜表面标签为 BCMA 胞外区或其保留有与抗 BCMA 抗体结合功能的变体，

更优选地，所述变体为截短变体、插入变体、缺失变体、取代变体或其组合；更优选地，所述变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:23 或 SEQ ID NO:25。

4、如权利要求 3 所述的修饰的 TIL，其特征在于，

所述膜锚定 IL-7 还包括位于 IL-7 和所述膜表面标签之间的接头；优选地，所述接头为刚性接头或软性接头，优选为刚性接头，和/或

所述膜锚定 IL-7 还包括位于所述跨膜区 N 端的铰链区或接头；优选地，所述铰链区包括但不限于：CD4 胞外铰链区、CD8 胞外铰链区、CD28 胞外铰链区、IgG1Fc

铰链区和 IgG4Fc 铰链区，所述接头为刚性接头或软性接头；更优选地，所述刚性接头的序列为选自 SEQ ID NO:9、11、15 和 17 中的任一种或多种；所述软性接头的序列为 SEQ ID NO:13。

所述膜锚定 IL-7 还包括信号肽；优选地，所述信号肽为 CD52 信号肽或 IL-7 信号肽。

5、如权利要求 1-3 中任一项所述的修饰的 TIL，其特征在于，所述膜锚定 IL-7 包含依次连接的：任选的信号肽、IL-7、任选的接头、BCMA 胞外区或其变体、任选的铰链区或接头、和跨膜区，所述信号肽是 CD52 信号肽或 IL-7 信号肽，所述跨膜区是 CD8 跨膜区或 CD52，

优选地，所述膜锚定 IL-7 包含依次连接的：信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和跨膜区，

更优选地，所述膜锚定 IL-7 包含依次连接的：

CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，

CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD52，

CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，

CD52 信号肽、IL-7、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，

IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，或

IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD52。

6、如权利要求 1-3 中任一项所述的修饰的 TIL，其特征在于，

所述 TIL 通过包含以下步骤的方法制备：用 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得 TIL 细胞群，或

所述 TIL 通过包含以下步骤的方法制备：（1）用 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得第一 TIL 细胞群，和（2）用 TIL 细胞扩增培养基孵育第一 TIL 细胞群，获得第二 TIL 细胞群。

7、如权利要求 6 所述的修饰的 TIL，其特征在于，所述样品选自：腹水、手术切除原发灶样本、同时性和异时性手术切除转移灶样本、穿刺样本和体液，

优选地，所述样品是含肿瘤细胞的组织；更优选地，所述肿瘤细胞来源于选自下组的肿瘤：黑色素瘤、胶质瘤、甲状腺肿瘤、胃癌、肺癌、胃肠道间质瘤、肠癌、肝癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜间质肉瘤、盆腔低分化腺癌、胆囊癌、胆管癌、头颈癌、结直肠癌、脑胶质瘤、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、肾癌和骨肉瘤，

优选地，所述体液包括血液、胸积液、组织液、淋巴液和/或腹水。

8、如权利要求 6 所述的修饰的 TIL，其特征在于，所述 TIL 种子细胞培养基包括以下的组分：细胞培养成分、细胞因子和免疫检查点抗体或其抗原结合片段，其中所述细胞因子包括 IL-2，所述免疫检查点包括：PD-1、LAG-3、TIGIT 和/或 CTLA-4，所述细胞培养成分为血清培养基或无血清培养基，

优选地，所述 TIL 种子细胞培养基还包括血清和/或抗生素，

更优选地，所述 TIL 种子细胞培养基包括以下组分的组合中的任一种：1）IL-2、IL-6、IL-21、IFN-γ、TIGIT 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；2）IL-2、IL-4、IL-10、IL-21、CD137 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；3）IL-2、IL-7、IL-12、IL-21、CD137 抗体、CD28 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；4）IL-1β、IL-2、IL-7、G-CSF、GM-CSF、IFN-γ、LAG3 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；5）IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、M-CSF、IFN-β、IFN-γ、TIGIT 抗体、CTLA-4 抗体和基础培养基；6）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、CD137 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；7）IL-2、IL-4、IL-10、IL-15、G-CSF、M-CSF、CD28 抗体、OX-40 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；8）IL-2、IL-7、IL-15、IFN-γ、CD137 抗体、CD40 抗体、OX-40 抗体、TIGIT 抗体、PD-1 抗体和基础培养基；9）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、IFN-γ、CD137 抗体、CD28 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；10）IL-2、IL-7、IL-12、G-CSF、GM-CSF、IFN-α、IFN-γ、CD28 抗体、CD40 抗体、TIGIT 抗体、PD-1 抗体、TNF-α和基础培养基；11）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、PD-1 抗体、RRx-001、CAL-101 和基础培养基；12）IL-2、IL-7、IL-15、GM-CSF、M-CSF、PD-1 抗体、CNI-1493 和基础培养基；13）IL-2、IL-7、IL-15、CD137 抗体、CD28 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、达沙替尼和基础培养基；14）IL-2、IL-6、IL-12、G-CSF、M-CSF、IFN-β、IFN-γ、CTLA-4 抗体、PD-1 抗体、达沙替尼、LYC-55716、GENE-1858 和基础培养基；15）IL-1α、IL-2、IL-9、IL-15、GM-

CSF、CD137 抗体、CD28 抗体、LAG3 抗体、TIGIT 抗体、CNI-1493 和基础培养基；16）IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、G-CSF、M-CSF、IFN-γ、CD28 抗体、CD40 抗体、LAG3 抗体、PD-1 抗体、CNI-1493、达沙替尼、GNE-1858 和基础培养基。

9、如权利要求 6 所述的修饰的 TIL，其特征在于，所述 TIL 细胞扩增培养基包含 IL-2、IL-7、IL-15 和免疫检查点抗体或其抗原结合片段，优选地，所述免疫检查点抗体包括 PD-1 抗体，

优选地，所述 TIL 细胞扩增培养基还包括血清、血小板、抗生素中的一种或多种，以及基础培养基，

更优选地，所述 TIL 细胞扩增培养基包含以下组分的组合中的任一种：17）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体和 GM-CSF；18）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体和 GITR 抗体；19）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、CD3 抗体和 CD28 抗体，优选地，所述 CD3 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；20）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体和 GM-CSF，优选地，所述 CD3 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；21）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体和 CD137 抗体，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；22）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、GITR 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、TWS119 和 CD137 抗体，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；23）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、TIGIT 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体和 GM-CSF，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；24）IL-2、IL-7、IL-15、LAG3 抗体、IL-21、IL-12、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体和 GITR 抗体，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；25）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、TIGIT 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体、CD40 抗体、OX-40 抗体和自体血小板，优选地，所述 CD3 抗体、CD137 抗体和 CD28 抗体与基质偶联；26）IL-2、IL-7、IL-15、PD-1 抗体、CTLA-4 抗体、CD3 抗体、CD28 抗体、CD137 抗体、GITR 抗体、GM-CSF、TWS119 和异体血小板，优选地，所述 CD3 抗体和 CD28 抗体与基质偶联。

10、如权利要求 8 或 9 所述的修饰的 TIL，其特征在于，

所述基础培养基选自 AIM-V、X-VIVO、DMEM、RPMI1640、OpTmizerTM 和 FUJIFILM Irvin MHM-C 中的任一种或几种，和/或

所述血清选自人 AB 血清、对象自体血清或动物源血清。

11、权利要求 1-9 中任一项所述的修饰的 TIL 的制备方法，包括向 TIL 中导入所述膜锚定 IL-7 的编码核酸，

优选地，所述导入是通过电转导入或脂质体纳米颗粒导入，

优选地，所述编码核酸是表达载体，包括病毒载体或非病毒载体，

优选地，所述表达载体包含编码权利要求 1-5 中任一项所记载的膜锚定 IL-7 的核酸序列，

更优选地，所述病毒载体为慢病毒载体，所述非病毒载体为基于转座子体系的载体；进一步更优选地，所述非病毒载体为基于 PiggyBac 转座系统或 Sleeping Beauty 转座系统的载体。

12、如权利要求 11 所述的修饰的 TIL 的制备方法，其特征在于，所述 TIL 由权利要求 6-8 中任一项所记载的制备 TIL 的方法所制备，

优选地，所述修饰的 TIL 的制备方法包括：1）用 TIL 种子细胞培养基孵育含 TIL 的样品，获得第一 TIL 细胞群；2）通过电转或脂质体纳米颗粒将所述表达膜锚定 IL-7 的核酸构建物导入所述第一 TIL 细胞群，获得第二 TIL 细胞群；和 3）用 TIL 细胞扩增培养基孵育所述第二 TIL 细胞群，获得第三 TIL 细胞群。

13、由权利要求 11 或 12 所述的修饰的 TIL 的制备方法制备得到的修饰的 TIL。

14、权利要求 1-9 中任一项所述的修饰的 TIL 在制备预防或治疗肿瘤的药物中的用途，

优选地，所述肿瘤选自以下的一种或多种：黑色素瘤、胶质瘤、甲状腺肿瘤、胃癌、肺癌、胃肠道间质瘤、肠癌、肝癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜间质肉瘤、盆腔低分化腺癌、胆囊癌、胆管癌、头颈癌、结直肠癌、脑胶质瘤、胰腺癌、膀

胱癌、前列腺癌、肾癌和骨肉瘤。

15、一种预防或治疗肿瘤的方法，包括向有需要的对象施用权利要求 1-9 中任一项所述的修饰的 TIL，

优选地，所述肿瘤选自以下的一种或多种：黑色素瘤、胶质瘤、甲状腺肿瘤、胃癌、肺癌、胃肠道间质瘤、肠癌、肝癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜间质肉瘤、盆腔低分化腺癌、胆囊癌、胆管癌、头颈癌、结直肠癌、脑胶质瘤、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、肾癌和骨肉瘤。

16、一种多肽，包含依次连接的：任选的信号肽、IL-7、任选的接头、BCMA 胞外区或其变体、任选的铰链区或接头、和跨膜区，所述信号肽是 CD52 信号肽或 IL-7 信号肽，所述跨膜区是 CD8 跨膜区或 CD52。

17、如权利要求 16 所述的多肽，所述多肽包含依次连接的：

CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，

CD52 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，

CD52 信号肽、IL-7、BCMA 胞外区或其变体、铰链区或接头、和 CD52，

IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD8 跨膜区，或

IL-7 信号肽、IL-7、接头、BCMA 胞外区或其变体、和 CD52。