(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 021 682**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2019 PCT/US2019/059720**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2020 WO20096989**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2019 E 19835913 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025 EP 3876957**

(54) Título: **Linfocitos infiltrantes de tumores para su uso en el tratamiento de pacientes con nsclc refractarios a los anticuerpos anti-pd-1**

(30) Prioridad:

05.11.2018 US 201862756025 P
20.09.2019 US 201962903627 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2025

(73) Titular/es:

IOVANCE BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.00%)
825 Industrial Road Suite 400
San Carlos, CA 94070, US

(72) Inventor/es:

FARDIS, MARIA y
NATARAJAN, ARVIND

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Linfocitos infiltrantes de tumores para su uso en el tratamiento de pacientes con nsclc refractarios a los anticuerpos anti-pd-1

FONDO DE LA INVENCIÓN

[0001] El tratamiento de cánceres voluminosos y refractarios mediante la transferencia adoptiva de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) representa un potente enfoque terapéutico para pacientes con mal pronóstico. Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393. Para que la inmunoterapia tenga éxito se requiere un gran número de TIL, y para su comercialización se necesita un proceso sólido y fiable. Esto ha sido todo un reto debido a los problemas técnicos, logísticos y normativos de la expansión celular. La expansión de TIL basada en IL-2 seguida de un "proceso de expansión rápida" (REP) se ha convertido en el método preferido para la expansión de TIL por su rapidez y eficacia. 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. El REP puede multiplicar por 1.000 los TIL en un periodo de 14 días, aunque requiere un gran exceso (*por ejemplo*, 200 veces) de células mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas (PBMC, también conocidas como células mononucleares (MNC)), a menudo de múltiples donantes, como células alimentadoras, así como anticuerpos anti-CD3 (OKT3) y altas dosis de IL-2. Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42. Los TIL que se han sometido a un procedimiento REP han producido una terapia celular adoptiva exitosa tras la inmunosupresión del huésped en pacientes con melanoma. Los parámetros actuales de aceptación de la infusión se basan en lecturas de la composición de los TIL (*por ejemplo*, positividad de CD28, CD8, o CD4) y en la expansión en pliegues y la viabilidad del producto REP. El documento WO 2018/129336 A1 describe métodos de expansión de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) utilizando un agonista de canal de potasio, tal como un agonista de KCa3.1 (canal IK), y usos de dichos TIL expandidos en el tratamiento de enfermedades. El documento WO 2018/094167 A1 describe métodos de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un número ampliado de linfocitos infiltrantes de tumores obtenidos a partir de restos tumorales a un paciente que lo necesite, para el tratamiento de un cáncer. El documento US 2018/207201 A1 describe métodos para expandir TIL y producir poblaciones terapéuticas de TIL, incluidos métodos para expandir poblaciones de TIL en un sistema cerrado que influyen en la eficacia, el fenotipo, y la salud metabólica de los TIL. El documento US2014/255368A1 describe métodos para la expansión de células T específicas de tumores que incluyen la obtención de una población enriquecida de células T a partir de un sujeto con cáncer, en los que la población enriquecida de células T se pone en contacto ex vivo con: (i) un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28, y/o fragmentos funcionales de los mismos, y (ii) un inhibidor de VEGF, para activar y expandir las células T.

[0002] Los procesos actuales de fabricación y tratamiento de TIL están limitados por la duración, el coste, los problemas de esterilidad, y otros factores descritos en el presente documento, de modo que el potencial para tratar a pacientes refractarios a los anti-PD1 y, como tales, se ha visto gravemente limitado. Existe una necesidad urgente de proporcionar procesos de fabricación de TIL y terapias basadas en dichos procesos que sean apropiadas para su uso en el tratamiento de pacientes para los que quedan muy pocas o ninguna opción de tratamiento viable. La presente invención satisface esta necesidad proporcionando un proceso de fabricación abreviado para su uso en la generación de TILs que luego pueden emplearse en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) que son refractarios al tratamiento anti-PD-1.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0003] Cualquier divulgación proporcionada en el presente documento relativa a métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia, o métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal, debe considerarse como la divulgación de sustancias o composiciones para su uso en dichos métodos.

[0004] La presente divulgación proporciona métodos mejorados y/o acortados para expandir TILs y producir poblaciones terapéuticas de TILs para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) que son refractarios al tratamiento anti-PD-1.

[0005] La invención reivindicada se expone en las reivindicaciones anexas y se refiere al suministro de una población de TIL para su uso en un método de tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

[0006] La invención reivindicada proporciona una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para su uso en un método de tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar una primera población de TIL obtenida y/o recibida de una resección quirúrgica, biopsia con aguja, biopsia de núcleo, biopsia pequeña, u otro medio para obtener una muestra que contenga una mezcla de células tumorales y TIL de un tumor de NSCLC de un paciente o proporcionar una primera población de TIL obtenida de un tumor resecado de un paciente que tenga NSCLC;

(b) poner en contacto fragmentos tumorales que comprenden la primera población de TIL con un primer medio de cultivo celular;

(c) realizar una expansión inicial de la primera población de TIL en el primer medio de cultura celular para obtener una segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 5 veces mayor en número que la primera población de TIL, donde el primer medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 (anticuerpo anti-CD3), y opcionalmente células presentadoras de antígeno (APCs) y además donde la expansión inicial se realiza durante un periodo de hasta o en 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días;

(d) realizar una expansión rápida de la segunda población de TIL en un segundo medio de cultura celular para obtener una tercera población de TIL, donde la tercera población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la segunda población de TIL después de 7 días desde el inicio de la expansión rápida; en el que el segundo medio de cultura celular comprende IL-2, OKT-3 (anticuerpo anti-CD3), y células presentadoras de antígeno (APC), que opcionalmente son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) alogénicas irradiadas; y en el que la expansión rápida se realiza durante un periodo de hasta o 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días, 9 días, 10 días u 11 días;

(e) recolección de la tercera población de TIL;

(f) administrar una porción terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL a un paciente con NSCLC;

donde el NSCLC es refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1.

[0007] En ciertas realizaciones, la expansión inicial se lleva a cabo durante 1 a 8 días y la segunda expansión se lleva a cabo durante 1 a 9 días.

[0008] En ciertas realizaciones, la expansión inicial se lleva a cabo durante 8 días y la segunda expansión se lleva a cabo durante 7 a 9 días.

[0009] En ciertas realizaciones, las APC se añaden en la etapa (c) en cualquier momento durante los días 4 a 7.

[0010] En ciertas realizaciones, los TIL se recolecciónn en el día 14 a 16 y donde la porción terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL para la administración al paciente tiene de 14 a 16 días.

[0011] En ciertas realizaciones, la primera población de TIL se obtiene utilizando un método de muestreo multilesional.

[0012] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-PD-L2.

[0013] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario no se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1.

[0014] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0015] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y se ha tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0016] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y se ha tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0017] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario no se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1 y se ha tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0018] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico.

[0019] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario tiene baja expresión de PD-L1, en las que opcionalmente el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1.

[0020] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1 y tiene baja expresión de PD-L1.

[0021] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y tiene baja expresión de PD-L1 o el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene baja expresión de PD-L1.

[0022] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con anticuerpo anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0023] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0024] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0025] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0026] En ciertas realizaciones, la enfermedad voluminosa se indica cuando el diámetro máximo del tumor es superior a 7 cm medido en el plano transversal o coronal o ganglios linfáticos inflamados con un diámetro en el eje corto de 20 mm o superior.

[0027] En ciertas realizaciones, el método comprende, antes de la etapa b;
fragmentando el tumor en fragmentos tumorales.

[0028] En ciertas realizaciones, el tumor se reseca de uno o más sitios tumorales.

[0029] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-PD-L2.

[0030] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1.

[0031] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico.

[0032] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y se ha tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0033] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario no se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1 y se ha tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0034] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico.

[0035] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario:

(a) ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene baja expresión de PD-L1;

(b) no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1 y tiene baja expresión de PD-L1;

(c) ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y tiene una expresión baja de PD-L1, o

(d) ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene baja expresión de PD-L1.

[0036] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0037] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0038] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0039] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio, opcionalmente donde dicha enfermedad voluminosa se indica cuando el diámetro máximo del tumor es mayor de 7 cm medido en el plano transversal o coronal o ganglios linfáticos inflamados con un diámetro de eje corto de 20 mm o mayor.

[0040] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario es refractario a al menos dos tratamientos sistémicos previos, sin incluir terapias neoadyuvantes o adyuvantes.

[0041] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 seleccionado del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, JS001, TSR-042, pidilizumab, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810,

MDX-1106, PDR001, anti-PD-1 de clon: RMP1-14, durvalumab, atezolizumab, avelumab, y sus fragmentos.

[0042] En ciertas realizaciones, el NSCLC refractario es refractario a pembrolizumab; nivolumab; un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab; un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab y pembrolizumab; un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab y nivolumab; durvalumab; atezolizumab; o avelumab.

[0043] En ciertas realizaciones, la IL-2 está presente en una concentración inicial de entre 1000 UI/mL y 6000 UI/mL en el primer medio de cultivo celular.

[0044] En ciertas realizaciones, la IL-2 está presente a una concentración inicial de entre 1000 UI/mL y 6000 UI/mL y el anticuerpo OKT-3 está presente a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/mL en el segundo medio de cultivo celular.

[0045] En ciertas realizaciones, la expansión inicial se lleva a cabo utilizando un recipiente permeable al gas y/o la expansión rápida se lleva a cabo utilizando un recipiente permeable al gas.

[0046] En ciertas realizaciones, el primer medio de cultivo celular comprende además una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, y combinaciones de las mismas y/o el segundo medio de cultivo celular comprende además una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-7, IL-15, IL- 21, y combinaciones de las mismas.

[0047] En ciertas realizaciones, el método comprende además la etapa de tratar al paciente con un régimen de linfodepleción no mieloablativo antes de administrar la tercera población de TIL al paciente y/o donde el método comprende además la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 que comienza el día después de la administración de la tercera población de TIL al paciente.

[0048] En ciertas realizaciones, el régimen de linfodepleción no mieloablativo comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguida de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días y/o el régimen de IL-2 es un régimen de IL-2 de dosis alta que comprende 600.000 o 720.000 UI/kg de aldesleukina, administrada como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

[0049] En ciertas realizaciones, el NSCLC es refractario a un tratamiento o terapia de combinación que comprende un anti-PD-1 y un agente quimioterapéutico, en el que opcionalmente el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, JS001, TSR-042, pidilizumab, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, anti-PD-1 del clon: RMP1-14, durvalumab, atezolizumab, avelumab, y fragmentos de los mismos o el anti-PD-1 es pembrolizumab.

[0050] En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es:

(i) un agente(s) quimioterapéutico(s) de doblete de platino, opcionalmente en el que la terapia de doblete de platino comprende:

(a) un primer agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en cisplatino y carboplatino, y

(b) un segundo agente quimioterapéutico seleccionado del grupo formado por vinorelbina, gemcitabina y un taxano (incluyendo, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel o nab-paclitaxel); y/o

(ii) en combinación con pemetrexed, en la que opcionalmente el NSCLC es refractario a una terapia de combinación que comprende carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, y cisplatino o el NSCLC es refractario a una terapia de combinación que comprende carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, cisplatino, nivolumab, e ipilimumab.

OTROS TEMAS

[0051] Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un método de tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) con una población de linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) que comprende las etapas de:

(a) obtención y/o recepción de una primera población de TIL a partir de una resección quirúrgica, biopsia con aguja, biopsia de núcleo, biopsia pequeña, u otro medio para obtener una muestra que contenga una mezcla de células tumorales y TIL de un tumor de NSCLC de un paciente;

(c) poner en contacto los fragmentos tumorales con un primer medio de cultivo celular;

(d) realizar una expansión inicial de la primera población de TIL en el primer medio de cultura celular para obtener una segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 5 veces

mayor en número que la primera población de TIL, donde el primer medio de cultura celular comprende IL-2;

(e) realizar una expansión rápida de la segunda población de TIL en un segundo medio de cultura celular para obtener una tercera población de TIL, donde la tercera población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la segunda población de TIL después de 7 días desde el inicio de la expansión rápida; donde el segundo medio de cultura celular comprende IL-2, OKT-3 (anticuerpo anti-CD3), y opcionalmente células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) alogénicas irradiadas; y donde la expansión rápida se realiza durante un periodo de 14 días o menos;

(f) recolección de la tercera población de TIL; y

(g) administrar una porción terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL a un paciente con NSCLC;

donde el NSCLC es refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1.

[0052] "Obtención" puede indicar que los TIL empleados en el método y/o proceso pueden derivarse directamente de la muestra (incluyendo de una resección quirúrgica, biopsia con aguja, biopsia de núcleo, biopsia pequeña, u otra muestra) como parte de las etapas del método y/o proceso. "Recibir" puede indicar que los TIL empleados en el método y/o proceso pueden derivarse indirectamente de la muestra (incluyendo de una resección quirúrgica, biopsia con aguja, biopsia de núcleo, biopsia pequeña, u otra muestra) y luego emplearse en el método y/o proceso, (por ejemplo, cuando la etapa (a) comienza con TIL que ya se han derivado de la muestra mediante un proceso separado no incluido en la parte (a), dichos TIL podrían denominarse "recibidos").

[0053] En algunas divulgaciones, la primera población de TIL comprende un método de muestreo multilesional.

[0054] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-PD-L2.

[0055] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1.

[0056] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico.

[0057] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y se ha tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0058] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y se ha tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0059] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico.

[0060] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario tiene baja expresión de PD-L1.

[0061] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene baja expresión de PD-L1.

[0062] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene baja expresión de PD-L1.

[0063] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y tiene baja expresión de PD-L1.

[0064] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene baja expresión de PD-L1

[0065] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0066] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0067] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0068] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0069] En algunas divulgaciones, la enfermedad voluminosa se indica cuando el diámetro máximo del tumor es mayor de 7 cm medido en el plano transversal o coronal o ganglios linfáticos inflamados con un diámetro de eje corto de 20 mm o mayor.

[0070] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a al menos dos tratamientos sistémicos previos, sin incluir terapias neoadyuvantes o adyuvantes.

[0071] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-PD-1 o un anti-PD-L1 seleccionado del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab, JS001, TSR-042, pidilizumab, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, anti-PD-1 de clon: RMP1-14, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en Patente de EE. UU. n.º 8.008.449, durvalumab, atezolizumab, avelumab, y fragmentos, derivados, variantes, así como biosimilares de los mismos.

[0072] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a pembrolizumab o a un biosimilar del mismo.

[0073] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a nivolumab o a un biosimilar del mismo.

[0074] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario al ipilimumab o a un biosimilar del mismo.

[0075] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a ipilimumab o un biosimilar del mismo y pembrolizumab o un biosimilar del mismo.

[0076] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a ipilimumab o un biosimilar del mismo y nivolumab o un biosimilar del mismo.

[0077] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a durvalumab o a un biosimilar del mismo.

[0078] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario al atezolizumab o a un biosimilar del mismo.

[0079] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a avelumab o a un biosimilar del mismo.

[0080] En algunas divulgaciones, la expansión inicial se realiza durante un período de 21 días o menos.

[0081] En algunas divulgaciones, la expansión inicial se realiza durante un período de 14 días o menos.

[0082] En algunas divulgaciones, la IL-2 está presente en una concentración inicial de entre 1000 UI/mL y 6000 UI/mL en el primer medio de cultivo celular.

[0083] En algunas divulgaciones, la IL-2 está presente a una concentración inicial de entre 1000 UI/mL y 6000 UI/mL y el anticuerpo OKT-3 está presente a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/mL en el segundo medio de cultivo celular.

[0084] En algunas divulgaciones, la expansión inicial se realiza utilizando un recipiente permeable al gas.

[0085] En algunas divulgaciones, la expansión rápida se realiza utilizando un recipiente permeable al gas.

[0086] En algunas divulgaciones, el primer medio de cultivo celular comprende además una citoquina seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, y combinaciones de las mismas.

[0087] En algunas divulgaciones, el segundo medio de cultivo celular comprende además una citoquina seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, y combinaciones de las mismas.

[0088] En algunas divulgaciones, el método comprende además la etapa de tratar al paciente con un régimen de linfodepleción no mieloablativo antes de administrar la tercera población de TIL al paciente.

[0089] En algunas divulgaciones, el régimen de linfodepleción no mieloablativo comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguida de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

[0090] En algunas divulgaciones, el método comprende además la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 que comienza el día después de la administración de la tercera población de TIL al paciente.

[0091] En algunas divulgaciones, el régimen de IL-2 es un régimen de IL-2 de dosis alta que comprende 600.000 o 720.000

UI/kg de aldesleucina, o un biosimilar o variante del mismo, administrado como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

[0092] También se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un método de tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) con una población de linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) que comprende las etapas de:

(a) resecar un tumor de un paciente, el tumor que comprende una primera población de TIL;

(b) fragmentación del tumor en fragmentos tumorales;

(c) poner en contacto los fragmentos tumorales con un primer medio de cultivo celular;

(d) realizar una expansión inicial de la primera población de TIL en el primer medio de cultura celular para obtener una segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 5 veces mayor en número que la primera población de TIL, donde el primer medio de cultura celular comprende IL-2;

(e) realizar una expansión rápida de la segunda población de TIL en un segundo medio de cultura celular para obtener una tercera población de TIL, donde la tercera población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la segunda población de TIL después de 7 días desde el inicio de la expansión rápida; donde el segundo medio de cultura celular comprende IL-2, OKT-3 (anticuerpo anti-CD3), y opcionalmente células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) alogénicas irradiadas; y donde la expansión rápida se realiza durante un periodo de 14 días o menos;

(f) recolección de la tercera población de TIL; y

(g) administrar una porción terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL a un paciente con cáncer;

donde el cáncer es refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1.

[0093] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1.

[0094] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1.

[0095] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico.

[0096] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y se ha tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0097] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no se ha tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y se ha tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0098] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico.

[0099] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario tiene baja expresión de PD-L1.

[0100] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene baja expresión de PD-L1.

[0101] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene baja expresión de PD-L1.

[0102] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y tiene baja expresión de PD-L1.

[0103] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene baja expresión de PD-L1.

[0104] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0105] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-

PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0106] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0107] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0108] En algunas divulgaciones, la enfermedad voluminosa se indica cuando el diámetro máximo del tumor es mayor de 7 cm medido en el plano transversal o coronal o ganglios linfáticos inflamados con un diámetro de eje corto de 20 mm o mayor.

[0109] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a al menos dos tratamientos sistémicos previos, sin incluir terapias neoadyuvantes o adyuvantes.

[0110] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, JS001, TSR-042, pidilizumab, (BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, anti-PD-1 de clon: RMP1-14, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en Patente de EE. UU. n.º 8.008.449, durvalumab, atezolizumab, avelumab, y fragmentos, derivados, variantes, así como biosimilares de los mismos.

[0111] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a pembrolizumab o a un biosimilar del mismo.

[0112] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a nivolumab o a un biosimilar del mismo.

[0113] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab o un biosimilar del mismo.

[0114] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab o un biosimilar del mismo y pembrolizumab o un biosimilar del mismo.

[0115] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab o un biosimilar del mismo y nivolumab o un biosimilar del mismo.

[0116] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a durvalumab o a un biosimilar del mismo.

[0117] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario al atezolizumab o a un biosimilar del mismo.

[0118] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a avelumab o a un biosimilar del mismo.

[0119] En algunas divulgaciones, la expansión inicial se realiza durante un período de 21 días o menos.

[0120] En algunas divulgaciones, la expansión inicial se realiza durante un período de 14 días o menos.

[0121] En algunas divulgaciones, la IL-2 está presente en una concentración inicial de entre 1000 UI/mL y 6000 UI/mL en el primer medio de cultivo celular.

[0122] En algunas divulgaciones, la IL-2 está presente a una concentración inicial de entre 1000 UI/mL y 6000 UI/mL y el anticuerpo OKT-3 está presente a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/mL en el segundo medio de cultivo celular.

[0123] En algunas divulgaciones, la expansión inicial se realiza utilizando un contenedor permeable al gas.

[0124] En algunas divulgaciones, la expansión rápida se realiza utilizando un recipiente permeable al gas.

[0125] En algunas divulgaciones, el primer medio de cultivo celular comprende además una citoquina seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, y combinaciones de las mismas.

[0126] En algunas divulgaciones, el segundo medio de cultivo celular comprende además una citoquina seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, y combinaciones de las mismas.

[0127] En algunas divulgaciones, el método comprende además la etapa de tratar al paciente con un régimen de linfodepleción no mieloablativo antes de administrar la tercera población de TIL al paciente.

[0128] En algunas divulgaciones, el régimen de linfodepleción no mieloablativo comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguida de la administración de fludarabina a una dosis

de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

[0129] En algunas divulgaciones, el método comprende además la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 que comienza el día después de la administración de la tercera población de TIL al paciente.

[0130] En algunas divulgaciones, el régimen de IL-2 es un régimen de IL-2 de dosis alta que comprende 600.000 o 720.000 UI/kg de aldesleucina, o un biosimilar o variante del mismo, administrado como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

[0131] También se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un método para tratar a un sujeto con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), donde el cáncer es refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1, comprendiendo el método la administración de linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) expandidos que comprenden:

(a) obtener y/o recibir una primera población de TIL de un tumor resecado de un sujeto procesando una muestra tumoral obtenida del sujeto en múltiples fragmentos tumorales;

(b) añadir los fragmentos tumorales en un sistema cerrado;

(c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultura celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, donde la primera expansión se realiza en un contenedor cerrado que proporciona una primera área de superficie permeable al gas, donde la primera expansión se realiza durante aproximadamente 3-11 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición de la etapa (b) a la etapa (c) se produce sin abrir el sistema;

(d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultura celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3, y células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante aproximadamente 7-11 días para obtener la tercera población de TIL, donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado que proporciona una segunda área de superficie permeable al gas, y donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;

(e) recolectar la población terapéutica de TIL obtenida en la etapa (d), donde la transición de la etapa (d) a la etapa (e) se produce sin abrir el sistema; y

(f) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (e) a una bolsa de infusión, donde la transferencia de la etapa (e) a la (f) se produce sin abrir el sistema;

(g) crioconservar la bolsa de infusión que contiene la población de TIL recolectada en la etapa (f) mediante un proceso de crioconservación; y

(h) administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL de la bolsa de infusión de la etapa (g).

[0132] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1.

[0133] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1.

[0134] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico.

[0135] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0136] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico.

[0137] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico.

[0138] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario tiene baja expresión de PD-L1.

[0139] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-

PD-L1 y tiene baja expresión de PD-L1.

[0140] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene baja expresión de PD-L1.

[0141] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y tiene baja expresión de PD-L1.

[0142] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene baja expresión de PD-L1.

[0143] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0144] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0145] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0146] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio.

[0147] En algunas divulgaciones, la enfermedad voluminosa se indica cuando el diámetro máximo del tumor es mayor de 7 cm medido en el plano transversal o coronal o ganglios linfáticos inflamados con un diámetro de eje corto de 20 mm o mayor.

[0148] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a al menos dos tratamientos sistémicos previos, sin incluir terapias neoadyuvantes o adyuvantes.

[0149] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, JS001, TSR-042, pidilizumab, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, anti-PD-1 de clon: RMP1-14, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en Patente de EE. UU. n.º 8.008.449, durvalumab, atezolizumab, avelumab, y fragmentos, derivados, variantes, así como biosimilares de los mismos.

[0150] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a pembrolizumab o a un biosimilar del mismo.

[0151] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a nivolumab o a un biosimilar del mismo.

[0152] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab o un biosimilar del mismo.

[0153] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab o un biosimilar del mismo y pembrolizumab o un biosimilar del mismo.

[0154] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab o un biosimilar del mismo y nivolumab o un biosimilar del mismo.

[0155] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a durvalumab o a un biosimilar del mismo.

[0156] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario al atezolizumab o a un biosimilar del mismo.

[0157] En algunas divulgaciones, el NSCLC refractario es refractario a avelumab o a un biosimilar del mismo.

[0158] En algunas divulgaciones, la expansión inicial se realiza durante un período de 21 días o menos.

[0159] En algunas divulgaciones, la expansión inicial se realiza durante un período de 14 días o menos.

[0160] En algunas divulgaciones, la IL-2 está presente en una concentración inicial de entre 1000 UI/mL y 6000 UI/mL en el primer medio de cultivo celular.

[0161] En algunas divulgaciones, la IL-2 está presente a una concentración inicial de entre 1000 UI/mL y 6000 UI/mL y el anticuerpo OKT-3 está presente a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/mL en el segundo medio de cultivo celular.

[0162] En algunas divulgaciones, la expansión inicial se realiza utilizando un contenedor permeable al gas.

[0163] En algunas divulgaciones, la expansión rápida se realiza utilizando un recipiente permeable al gas.

[0164] En algunas divulgaciones, el primer medio de cultivo celular comprende además una citoquina seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, y combinaciones de las mismas.

[0165] En algunas divulgaciones, el segundo medio de cultivo celular comprende además una citoquina seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-7, IL-15,IL-21, y combinaciones de las mismas.

[0166] En algunas divulgaciones, el método comprende además la etapa de tratar al paciente con un régimen de linfodepleción no mieloablativo antes de administrar la tercera población de TIL al paciente.

[0167] En algunas divulgaciones, el régimen de linfodepleción no mieloablativo comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguida de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

[0168] En algunas divulgaciones, el método comprende además la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 que comienza el día después de la administración de la tercera población de TIL al paciente.

[0169] En algunas divulgaciones, el régimen de IL-2 es un régimen de IL-2 de dosis alta que comprende 600.000 o 720.000 UI/kg de aldesleucina, o un biosimilar o variante del mismo, administrado como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

[0170] En algunas divulgaciones, el NSCLC es refractario a un tratamiento de combinación que comprende un anti-PD-1 y un agente quimioterapéutico.

[0171] En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, JS001, TSR-042, pidilizumab, (BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, anti-PD-1 de clon: RMP1-14, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en Patente de EE. UU. n.º 8.008.449, durvalumab, atezolizumab, avelumab, y fragmentos, derivados, variantes, así como biosimilares de los mismos.

[0172] En algunas divulgaciones, el antiPD-1 es pembrolizumab.

[0173] En algunas divulgaciones, el(los) agente(s) quimioterapéutico(s) es(son) un agente quimioterapéutico de doblete de platino.

[0174] En algunas divulgaciones, la terapia de doblete de platino comprende:

i) un primer agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en cisplatino y carboplatino,

ii) y un segundo agente quimioterapéutico seleccionado del grupo formado por vinorelbina, gemcitabina y un taxano (incluyendo, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel o nab-paclitaxel).

[0175] En algunas divulgaciones, el agente quimioterapéutico está en combinación con pemetrexed.

[0176] En algunas divulgaciones, el NSCLC es refractario a una terapia de combinación que comprende carboplatino, paclitaxel, pemetrexed y cisplatino.

[0177] En algunas divulgaciones, el NSCLC es refractario a una terapia de combinación que comprende carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, cisplatino, nivolumab, e ipilimumab.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0178]

Figura 1: Ejemplo de gráfico del Proceso 2A que ofrece una visión general de las Etapas A a F.

Figura 2: Diagrama de flujo del proceso 2A.

Figura 3: Muestra un diagrama de una realización de un proceso de fabricación ejemplar de TIL criopreservados (~22 días).

Figura 4: Muestra un diagrama de una realización del proceso 2A, un proceso de 22 días para la fabricación de TIL.

Figura 5: Tabla comparativa de las etapas A a F de las realizaciones ejemplares del proceso 1C y el proceso 2A.

Figura 6: Comparación detallada de una realización del proceso 1C y una realización del proceso 2A.

Figura 7: Proceso ejemplar de tipo GEN 3 para tumores NSCLC.

Figura 8A-8B: **A**) Muestra una comparación entre el proceso 2A (proceso de aproximadamente 22 días) y una variante del proceso Gen 3 para la fabricación de TIL (proceso de aproximadamente 14 a 16 días). **B**) Gráfico Gen3 del Proceso Ejemplar que ofrece una visión general de las Etapas A a F (proceso de aproximadamente 14 a 16 días). C) Gráfico con tres procesos ejemplares de Gen 3 con un resumen de las etapas A a F (proceso de aproximadamente 14 a 16 días) para cada una de las tres variaciones del proceso.

Figura 9: Proporciona un diagrama de flujo experimental para la comparabilidad entre GEN 2 (proceso 2A) frente a GEN 3.

Figura 10A-10C: **A**) L4054 - Caracterización fenotípica del producto TIL en el proceso Gen 2 y Gen 3. **B**) L4055-Caracterización fenotípica del producto TIL en el proceso Gen 2 y Gen 3. C) M1085T-Caracterización fenotípica del producto TIL en el proceso Gen 2 y Gen 3.

Figura 11A-11C: **A**) L4054 - Análisis de marcadores de memoria en el producto TIL de los procesos Gen 2 y Gen 3. **B**) L4055 - Análisis de marcadores de memoria en el producto TIL de los procesos Gen 2 y Gen 3. **C**) M1085T- Análisis de marcadores de memoria en el producto TIL de los procesos Gen 2 y Gen 3.

Figura 12: L4054 Marcadores de activación y agotamiento (**A**) Activado en CD4+,**(B**) Activado en CD8+.

Figura 13: L4055 Marcadores de activación y agotamiento (**A**) Activado en CD4+,**(B**) Activado en CD8+.

Figura 14: Producción de IFNγ (pg/mL): (A) L4054, (B) L4055, y (C) M1085T para los procesos Gen 2 y Gen 3: Cada barra representada aquí es la media + SEM de los niveles de IFNγ de las células estimuladas, no estimuladas y de control del medio. Densidad óptica medida a 450 nm.

Figura 15: Análisis ELISA de la concentración de IL-2 en el sobrenadante del cultivo celular: **(A**) **L4054** y **(B**) **L4055.** Cada barra representada aquí es la media + SEM de los niveles de IL-2 en los medios gastados. Densidad óptica medida a 450 nm.

Figura 16: Cuantificación de glucosa y lactato (g/L) en medios gastados: (A) Glucosa y (B) Lactato: En las dos líneas tumorales, y en ambos procesos, se observó una disminución de la glucosa a lo largo de la expansión REP. Por el contrario, como era de esperar, se observó un aumento del lactato. Tanto la disminución de la glucosa como el aumento del lactato fueron comparables entre los procesos Gen 2 y Gen 3.

Figura 17: A) Cuantificación de L-glutamina en medios gastados para L4054 y L4055. **B**) Cuantificación de Glutamax en medios gastados para L4054 y L4055. C) Cuantificación del amoníaco en los medios usados para L4054 y L4055.

Figura 18: Análisis de la longitud de los telómeros. El valor de la longitud telomérica relativa (RTL) indica que la fluorescencia telomérica media por cromosoma/genoma en el proceso Gen 2 y Gen 3 de la fluorescencia telomérica por cromosoma/genoma en la línea celular de control (línea celular de leucemia 1301) utilizando el kit DAKO.

Figura 19: Análisis de la secuencia CDR3 única para el producto final TIL en L4054 y L4055 según el proceso Gen 2 y Gen 3. Las columnas muestran el número de clonotipos TCR B únicos identificados a partir de 1×10^6 células recogidas en el proceso Gen 2 (*por ejemplo,* el día 22) y Gen 3 (*por ejemplo*, el día 14-16) del día de la recolección. El Gen 3 muestra una mayor diversidad clonal en comparación con el Gen 2 basándose en el número de CDR de péptidos únicos dentro de la muestra.

Figura 20: Frecuencia de secuencias CDR3 únicas en el producto celular final recolecciónd o de L4054 IL (Gen 2 (*por ejemplo,* día 22) y proceso Gen 3 (*por ejemplo,* día 14-16)).

Figura 21: Frecuencia de secuencias CDR3 únicas en el producto celular final recolecciónd o de L4055 TIL (Gen 2 (*por ejemplo,* día 22) y proceso Gen 3 (*por ejemplo,* día 14-16)).

Figura 22: Índice de diversidad para el producto final TIL en L4054 y L4055 bajo proceso Gen 2 y Gen

3. El índice de diversidad de entropía de Shanon es una métrica de comparación más fiable y común. Gen 3 L4054 y L4055 mostraron una diversidad ligeramente superior a Gen 2.

Figura 23: Los datos brutos de los recuentos celulares Día 7-Gen 3 REP iniciación se presentan en la Tabla 45 (véase el Ejemplo 8 a continuación).

Figura 24: Los datos brutos de los recuentos celulares Día 11-Inicio de Gen 2 REP y Gen 3 Scale Up se presentan en la Tabla 45 (véase el Ejemplo 8 a continuación).

Figura 25: Datos brutos de los recuentos celulares Día 16-Gen 2 Scale Up y Gen 3 Harvest (*por ejemplo,* día 16) presentados en la Tabla 46 (véase el Ejemplo 8 a continuación).

Figura 26: Los datos brutos de los recuentos celulares Día 22-Recolección Gen 2 (*por ejemplo*, día 22) se presentan en la Tabla 46 (véase el Ejemplo 8 más adelante). Para L4054 Gen 2, el recuento post LOVO se extrapoló a 4 matraces, porque era el número total del estudio. Se contaminó 1 matraz y la extrapolación se hizo para total = 6,67E+10.

Figura 27: Datos brutos de los resultados de citometría de flujo representados en las Figs. 10A, 10A, y 10B.

Figura 28: Datos brutos de los resultados de citometría de flujo representados en las Figs. 10C y 10C.

Figura 29: Los datos brutos de los resultados de la citometría de flujo se muestran en las Figs. 12 y 13.

Figura 30: Los datos brutos de los resultados del ensayo de producción de IFNγ para las muestras L4054 se muestran en la Fig. 14.

Figura 31: Los datos brutos de los resultados del ensayo de producción de IFNγ para las muestras L4055 se muestran en la Fig. 14.

Figura 32: Los datos brutos de los resultados del ensayo de producción de IFNγ para las muestras M1085T se muestran en la Fig. 14.

Figura 33: Los datos brutos de los resultados del ensayo ELISA de IL-2 se muestran en la Fig. 15.

Figura 34: Datos brutos del sustrato metabólico y resultados del análisis metabólico presentados en las Figs. 16 y 17.

Figura 35: Los datos brutos para el análisis de la longitud relativa de los telómeros se presentan en la Fig. 18.

Figura 36: Los datos brutos de la secuencia CD3 única y los resultados de los análisis de diversidad clonal se presentan en las Figs. 19 y 22.

Figura 37: Muestra una comparación entre varios Gen 2 (proceso 2A) y la encarnación del proceso Gen 3.1.

Figura 38: Tabla en la que se describen diversas características de las realizaciones del proceso Gen 2, Gen 2.1 y Gen 3.0.

Figura 39: Visión general de las condiciones de los medios para una realización del proceso Gen 3, denominado Gen 3.1.

Figura 40: Tabla en la que se describen diversas características de las realizaciones del proceso Gen 2, Gen 2.1 y Gen 3.0.

Figura 41: Tabla comparativa de diversas características de los procesos Gen 2 y Gen 3.0.

Figura 42: Tabla que proporciona los usos de los medios en las diversas realizaciones de los procesos de expansión descritos.

Figura 43: Comparación de fenotipos: Las realizaciones Gen 3.0 y Gen 3.1 del proceso mostraron una expresión comparable de CD28, CD27 y CD57.

Figura 44: Mayor producción de IFNγ en el producto final Gen 3. Se evaluó el análisis de IFNγ (mediante ELISA) en el sobrenadante congelado del cultivo para comparar ambos procesos. Para cada tumor,

estimulación de una noche con placa recubierta anti -CD3, utilizando producto TIL fresco en cada proceso Gen 2 (*por ejemplo,* día 22) y Gen 3 (*por ejemplo,* día 16). Cada barra representa los niveles de IFN de los controles estimulado, no estimulado y medio.

Figura 45: Top. Análisis de la secuencia CDR3 única para el producto final TIL: Las columnas muestran el número de clonotipos TCR B únicos identificados a partir de 1 × 10^6 células recogidas en el proceso Gen 2 *(por ejemplo,* día 22) y Gen 3 *(por ejemplo,* día 14-16). El Gen 3 muestra una mayor diversidad clonal en comparación con el Gen 2 basándose en el número de CDR de péptidos únicos dentro de la muestra. Abajo: Índice de diversidad del producto final TIL: El índice de diversidad de entropía de Shanon es una métrica común más fiable para la comparación. El Gen 3 mostró una diversidad ligeramente superior a la del Gen 2.

Figura 46: 199 secuencias son compartidas entre el producto final Gen 3 y Gen 2, lo que corresponde al 97,07% del 80% superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 2 compartidas con el producto final Gen 3.

Figura 47: 1833 secuencias son compartidas entre el producto final Gen 3 y Gen 2, lo que corresponde al 99,45% del 80% superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 2 compartidas con el producto final Gen 3.

Figura 48: Esquema de una realización ejemplar del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 49: Esquema de una realización ejemplar de un método de expansión de células T de neoplasias hematopoyéticas utilizando la plataforma de expansión Gen 3.

Figura 50: En las estructuras I-A y I-B, los cilindros se refieren a dominios individuales de unión a polipéptidos. Las estructuras I-A e I-B comprenden tres dominios de unión a TNFRSF enlazados linealmente derivados de, por ejemplo, 4-1BBL o un anticuerpo que se une a 4-1BB, que se pliegan para formar una proteína trivalente, que a continuación se une a una segunda proteína trivalente a través de IgG1-Fc (incluidos los dominios CH3 y CH2) se utiliza entonces para unir dos de las proteínas trivalentes a través de enlaces disulfuro (pequeños óvalos alargados), estabilizando la estructura y proporcionando un agonista capaz de reunir los dominios de señalización intracelular de los seis receptores y proteínas de señalización para formar un complejo de señalización. Los dominios de unión a TNFRSF denotados como cilindros pueden ser dominios scFv que comprenden, por ejemplo, una cadena VH y una VL conectadas por un enlazador que puede comprender residuos hidrofílicos y secuencias Gly y Ser para flexibilidad, así como Glu y Lys para solubilidad.

Figura 51: Esquema de una realización ejemplar del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 52: Proporciona una visión general del proceso para una realización ejemplar (Prueba Gen 3.1) del proceso Gen 3.1 (un proceso de 16 días).

Figura 53: Proporciona datos de proliferación TIL, recuento medio total de células viables por fragmento tumoral, porcentaje de viabilidad en el día de la recolección y recuento total de células viables (TVC) en el día de la recolección para realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test). La prueba Gen 3.1 (que incluye la adición de OKT-3 y alimentadores el Día 0) alcanzó la capacidad máxima del matraz en el momento de la recolección. Si se inicia un máximo de 4 matraces en el día 0, cada recolección de TVC debe multiplicarse por 4.

Figura 54: Gráfico de barras que representa el recuento total de células viables (TVC) y el porcentaje de viabilidad para realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test), un proceso de 16 días.

Figura 55: Proporciona datos que muestran que las realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) produjeron células que mostraron una expresión comparable de CD28, CD27 y CD57.

Figura 56: Proporciona datos que muestran que los estados de memoria TIL eran comparables entre las células producidas por realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, y Gen 3.1 Test). Los estados de memoria de REP TIL se representan de la siguiente manera: Los subconjuntos de memoria TIL CD4+ o CD8+ se dividieron en diferentes subconjuntos de memoria. Naive (CD45RA+CD62L+), CM: Memoria central (CD45RA-CD62L+), EM: Memoria efector (CD45RA-CD62L-), TEMRA/TEFF: Memoria efector/efectores RA+ (CD45RA+CD62L+). El gráfico de barras presentado es el porcentaje positivo CD45+/-CD62L +/- cuando activado en CD4+ o CD8+.

Figura 57: Proporciona datos que muestran que los marcadores de activación/agotamiento de TIL eran

comparables entre las células producidas por realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, y Gen 3.1 Ensayo) cuando activado en CD4+. La activación y el agotamiento de REP TIL se determinaron mediante citometría de flujo multicolor. Las muestras de TIL recolectadas se tiñeron con anticuerpos de citometría de flujo (CD3-BUV395, PD-1-BV421, 2B4/CD244-PB, CD8-BB515, CD25-BUV563, BTLA-PE, KLRG1-PE-Dazzle 594, TIM-3-BV650, CD194/CCR4-APC, CD4-VioGreen, TIGIT-PerCP-eFluor 710, CD183-BV711, CD69-APC-R700, CD95-BUV737, CD127-PE-Cy7, CD103-BV786, LAG-3-APC-eFluor 780). El gráfico de barras presentado es el porcentaje de TIL CD4+ o CD8+ de TIL REP.

Figura 58: Proporciona datos que muestran que los marcadores de activación/agotamiento de TIL eran comparables entre las células producidas por realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1) cuando activado en CD8+. La activación y el agotamiento de REP TIL se determinaron mediante citometría de flujo multicolor. Las muestras recolecciónndas de TIL se tiñeron con anticuerpos de citometría de flujo (CD3-BUV395, PD-1-BV421, 2B4/CD244-PB, CD8-BB515, CD25-BUV563, BTLA-PE, KLRG1-PE-Dazzle 594, TIM-3-BV650, CD194/CCR4-APC, CD4-VioGreen, TIGIT-PerCP-eFluor 710, CD183-BV711, CD69-APC-R700, CD95-BUV737, CD127-PE-Cy7, CD103-BV786, LAG-3-APC-eFluor 780). El gráfico de barras presentado es el porcentaje de TIL CD4+ o CD8+ de TIL REP.

Figura 59: Proporciona datos que muestran una mayor producción de IFN-γ exhibida por el producto final Gen 3.1. Se evaluó el análisis de IFNγ ELISA en el sobrenadante congelado del cultivo para comparar ambos procesos. Para cada tumor, estimulación de una noche con placa recubierta anti -CD3, utilizando producto TIL fresco en cada día de recolección. Cada barra representa aquí son los niveles de IFN-γ de estimulado, no estimulado y control de los medios de comunicación.

Figura 60: Proporciona datos que muestran que la concentración de IL-2 en el sobrenadante era comparable en todas las realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test) utilizando medios estándar. Panel izquierdo: L4063- Medios estándar Gen 2. Panel derecho: L4064- CTS Optimizer Media. *ELISA realizado con diluyente AIM V

Figura 61: Proporciona datos que muestran que las concentraciones de metabolitos eran comparables en los sobrenadantes de todas las realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test). Los L4063 TIL se expandieron en medios estándar. Los L4064 TIL se expandieron en medios CTS Optimizer.

Figura 62: Análisis de la longitud de los telómeros en realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test). Análisis de la longitud de los telómeros para las células producidas por los números de identificación tumoral L4063 y L4064: el valor de la longitud relativa de los telómeros (RTL) indica la fluorescencia media de los telómeros por cromosoma/genoma en las células producidas por los procesos Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test sobre la fluorescencia de los telómeros por cromosoma/genoma en la línea de células control (línea celular de leucemia 1301) utilizando el kit DAKO.

Figura 63: Esquema de una realización ejemplar del proceso Gen 3.1 Test (Gen 3.1 optimizado) (un proceso de 16-17 días).

Figura 64: Esquema de una realización ejemplar del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 65A-65B: Tablas comparativas de procesos ejemplares de Gen 2 y Gen 3 con diferencias ejemplares resaltadas.

Figura 66: Esquema de una realización ejemplar del calendario de preparación del proceso Gen 3 (un proceso de 16/17 días).

Figura 67: Esquema de una realización ejemplar del proceso Gen 3 (un proceso de 14-16 días).

Figura 68: Resumen de los datos del Día 16/17 de tres ejecuciones de ingeniería de una realización ejemplar del proceso Gen 3.

Figura 69: Datos relativos al fenotipo ampliado de TIL: se muestran las características de diferenciación frente a las especificaciones de identidad (ID) de TIL para células producidas por dos ejecuciones de ingeniería de una realización de proceso Gen 3 ejemplar.

Figura 70: Datos relativos al fenotipo ampliado de las células TIL expandidas a partir de tumores de pulmón: se muestran las características de diferenciación frente a las especificaciones de identidad (ID) de las células TIL producidas por dos ejecuciones de desarrollo del proceso (PD) de una realización

ejemplar del proceso Gen 3 utilizando tejidos tumorales de pulmón.

Figura 71: Datos relativos al fenotipo ampliado (pureza, identidad y memoria) de los TIL expandidos a partir de tumores ováricos: se muestran las características fenotípicas de pureza, identidad y memoria de las células expandidas a partir de tumores ováricos utilizando realizaciones ejemplares del proceso Gen 2, Gen 3.1, y FR ER (Frozen tumor, Early REP); * indica condición no probada; ^{Y} indica problema de muestreo, recuento bajo de TVC o células no viables en la descongelación.

Figura 72: Se muestra la estrategia de selección para la caracterización de TIL (se muestra la jerarquía de selección) y los datos relativos a las características fenotípicas ampliadas de las células producidas por dos ejecuciones de ingeniería de una realización de proceso Gen 3 ejemplar.

Figura 73: Se muestra la estrategia de separación para la caracterización de TIL (se muestra la jerarquía de separación) y los datos relativos a las características fenotípicas ampliadas de la subpoblación CD4+ y la subpoblación CD8+ de células producidas por dos ejecuciones de ingeniería de una realización de proceso Gen 3 ejemplar.

Figura 74: Se muestran los datos relativos al análisis ELISA de la Granzima B de las células producidas por dos ejecuciones de ingeniería de una realización ejemplar del proceso Gen 3.

Figura 75A-75B: Esquema de una realización ejemplar del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 76: Esquema de una realización ejemplar del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 77: Comparación de Gen 2, Gen 2.1 y una realización del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 78: Comparación de Gen 2, Gen 2.1 y una realización del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 79: Componentes de la realización Gen 3.

Figura 80: Comparación del diagrama de flujo de la realización Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 control, Gen 3.1 Test).

Figura 81: Se presenta el recuento total de células viables y la expansión de pliegues para las realizaciones ejemplares de Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultivo celular estándar y medios de cultivo celular sin suero.

Figura 82: Puntuaciones de viabilidad en % tras la reactivación, la ampliación del cultivo y la recolección de TIL se presentan para realizaciones ejemplares de Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero.

Figura 83: Se presenta la caracterización fenotípica del producto final TIL producido mediante el procesamiento de muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular CTS sin suero.

Figura 84: Se presenta el análisis de marcadores de memoria del producto TIL producido al procesar muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular CTS sin suero.

Figura 85: Se presentan los marcadores de activación y agotamiento de TIL producidos mediante el procesamiento de muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS seguidos de clasificación de células ativada por CD4+.

Figura 86: Se presentan los marcadores de activación y agotamiento de TIL producidos mediante el procesamiento de muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS seguidos de clasificación de células ativada por CD8+.

Figura 87: Se presentan las puntuaciones de producción de IFN-γ (pg/mL) para el producto final de TIL producido mediante el procesamiento de muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS.

Figura 88: Se presenta el análisis de la concentración de IL-2 (pg/mL) de los medios gastados (recogidos tras la reactivación, la ampliación del cultivo y la recolección de TIL) del procesamiento de muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS.

Figura 89: Se presenta la concentración de glucosa (g/L) en los medios gastados (recogidos tras la reactivación, la ampliación del cultivo y la recolección de TIL) del procesamiento de muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS.

Figura 90: Se presenta la concentración de lactato (g/L) en los medios gastados (recogidos tras la reactivación, la ampliación del cultivo y la recolección de TIL) del procesamiento de muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS.

Figura 91: Se presenta la concentración de glutamina (mmol/L) en los medios gastados (recogidos tras la reactivación, la ampliación del cultivo y la recolección de TIL) del procesamiento de muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS.

Figura 92: Se presenta la concentración de glutamax (mmol/L) en los medios gastados (recogidos tras la reactivación, la ampliación del cultivo y la recolección de TIL) del procesamiento de muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS.

Figura 93: Se presenta la concentración de amoníaco (mmol/L) en los medios gastados (recogidos tras la reactivación, la ampliación del cultivo y la recolección de TIL) del procesamiento de muestras de tumor L4063 y L4064 en procesos Gen 3 ejemplares (Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS. Análisis de la longitud de los telómeros en realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test). Análisis de la longitud de los telómeros para las células producidas por los números de identificación tumoral L4063 y L4064: el valor de la longitud relativa de los telómeros (RTL) indica la fluorescencia media de los telómeros por cromosoma/genoma en las células producidas por los procesos Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test sobre la fluorescencia de los telómeros por cromosoma/genoma en la línea de células control (línea celular de leucemia 1301) utilizando el kit DAKO.

Figura 94: Análisis de la longitud de los telómeros en TIL producidos por realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS. Análisis de la longitud de los telómeros para las células producidas por los números de identificación tumoral L4063 y L4064: el valor de la longitud relativa de los telómeros (RTL) indica la fluorescencia media de los telómeros por cromosoma/genoma en las células producidas por los procesos Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test sobre la fluorescencia de los telómeros por cromosoma/genoma en la línea de células control (línea celular de leucemia 1301) utilizando el kit DAKO.

Figura 95: Resumen del repertorio de TCR Vβ para TIL producido por realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test) utilizando medios de cultura celular estándar y medios de cultura celular sin suero CTS. Se describe la clonalidad de TIL para el producto final de TIL obtenido por los números de identificación de tumor L4063 y L4064 producidos por los procesos Gen 3.0, Gen 3.1 Control y Gen 3.1 Test, medida por el repertorio TCR Vβ de secuencias CDR3 únicas.

Figura 96: Comparación de TIL producidos por realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test) con respecto a la frecuencia de secuencias CDR3 únicas en TIL recolecciónda producto del procesamiento de muestras tumorales L4063.

Figura 97: Comparación de TIL producidos por realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test) con respecto al porcentaje de secuencias CDR3 únicas compartidas en el producto celular TIL recolecciónd a partir del procesamiento de muestras tumorales L4063: 975 secuencias son compartidas entre el producto final Gen 3.0 y Gen 3.1 Test, lo que equivale al 88% del 80% superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 3.0 compartidas con el producto final Gen 3.1 Test.

Figura 98: Comparación de TIL producidos por realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test) con respecto al porcentaje de secuencias CDR3 únicas compartidas en el producto celular recolecciónd de TIL para el procesamiento de muestras tumorales L4064: 2163 secuencias son compartidas entre el producto final Gen 3.0 y Gen 3.1 Test, lo que equivale al 87% del

80% superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 3.0 compartidas con el producto final Gen 3.1 Test.

Figura 99: Comparación de TIL producidos por realizaciones ejemplares del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Control, Gen 3.1 Test) con respecto a la frecuencia de secuencias CDR3 únicas en TIL recolecciónda producto del procesamiento de muestras tumorales L4064.

Figura 100: Se muestran los componentes de una realización ejemplar del proceso Gen 3 (Gen 3-Optimizado, un proceso de 16-17 días).

Figura 101: Tabla de criterios de aceptación.

Figura 102: Día de reactivación del recuento celular.

Figura 103: Día de la ampliación de los recuentos celulares.

Figura 104: Recuento de células Recolección L4063.

Figura 105: Recuento de células Recolección L4064.

Figura 106: Datos de flujo.

Figura 107: Datos de flujo.

Figura 108: Datos de flujo.

Figura 109: Datos de flujo.

Figura 110: Datos de producción de IFN-γ Figura 7-L4063.

Figura 111: Datos de producción de IFN-γ Figura 7-L4064.

Figura 112: Análisis ELISA de los datos de concentración de IL-2.

Figura 113: Tabla resumen de datos metabólicos.

Figura 114: Datos resumidos.

Figura 115: Datos resumidos.

Figura 116: Índice de diversidad de Shannon.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

[0179]

SEQ ID N.º:1 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del muromonab.

SEQ ID N.º:2 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del muromonab.

SEQ ID N.º:3 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-2 humana recombinante.

SEQ ID N.º:4 es la secuencia de aminoácidos de la aldesleucina.

SEQ ID N.º:5 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-4 humana recombinante.

SEQ ID N.º:6 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-7 humana recombinante.

SEQ ID N.º:7 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-15 humana recombinante.

SEQ ID N.º:8 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-21 humana recombinante.

SEQ ID N.º:9 es la secuencia de aminoácidos del 4-1BB humano.

SEQ ID Nº: 10 es la secuencia de aminoácidos del 4-1BB murino.

SEQ ID N.º:11 es la cadena pesada del anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID N.º:12 es la cadena ligera del anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID N.º:13 es la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID N.º:14 es la región variable de la cadena ligera (VL) para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID N.º:15 es la cadena pesada CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID N.º:16 es la cadena pesada CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID N.º:17 es la cadena pesada CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID N.º:18 es la cadena ligera CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID N.º:19 es la cadena ligera CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID N.º:20 es la cadena ligera CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID N.º:21 es la cadena pesada del anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID N.º:22 es la cadena ligera del anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).
SEQ ID N.º:23 es la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID N.º:24 es la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID N.º:25 es la cadena pesada CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID N.º:26 es la cadena pesada CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID N.º:27 es la cadena pesada CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID N.º:28 es la cadena ligera CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID N.º:29 es la cadena ligera CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID N.º:30 es la cadena ligera CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID N.º:31 es un dominio Fc para una proteína de fusión agonista TNFRSF.

SEQ ID N.º:32 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:33 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:34 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:35 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:36 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:37 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:38 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:39 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:40 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:41 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:42 es un dominio Fc para una proteína de fusión agonista TNFRSF.

SEQ ID N.º:43 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:44 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:45 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID N.º:46 es una secuencia de aminoácidos del ligando 4-1BB (4-1BBL).

SEQ ID N.º:47 es una porción soluble del polipéptido 4-1BBL.

SEQ ID N.º:48 es una región variable de cadena pesada (VH) para el anticuerpo agonista 4-1BB 4B4-1-1 versión 1.

SEQ ID N.º:49 es una región variable de cadena ligera (VL) para el anticuerpo agonista 4-1BB 4B4-1-1 versión 1.

SEQ ID N.º:50 es una región variable de cadena pesada (VH) para el anticuerpo agonista 4-1BB 4B4-1-1 versión 2.

SEQ ID N.º:51 es una región variable de cadena ligera (VL) para el anticuerpo agonista 4-1BB 4B4-1-1 versión 2.

SEQ ID N.º:52 es una región variable de cadena pesada (VH) para el anticuerpo agonista 4-1BB H39E3-2.

SEQ ID N.º:53 es una región variable de cadena ligera (VL) para el anticuerpo agonista 4-1BB H39E3-2.

SEQ ID N.º:54 es la secuencia de aminoácidos de OX40 humana.

SEQ ID N.º:55 es la secuencia de aminoácidos de la OX40 murina.

SEQ ID N.º:56 es la cadena pesada del anticuerpo monoclonal agonista de OX40 tavolixizumab (MEDI-0562).

SEQ ID N.º:57 es la cadena ligera del anticuerpo monoclonal agonista de OX40 tavolixizumab (MEDI-0562).

SEQ ID N.º:58 es la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal agonista de OX40 tavolixizumab (MEDI-0562).

SEQ ID N.º:59 es la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal agonista de OX40 tavolixizumab (MEDI-0562).

SEQ ID N.º:60 es la cadena pesada CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumab (MEDI-0562).

SEQ ID N.º:61 es la cadena pesada CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumab (MEDI-0562).

SEQ ID N.º:62 es la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal agonista de OX40 tavolixizumab (MEDI-0562).

SEQ ID N.º:63 es la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal agonista de OX40 tavolixizumab (MEDI-0562).

SEQ ID N.º:64 es la cadena ligera CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumab (MEDI-0562).

SEQ ID N.º:65 es la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal agonista de OX40 tavolixizumab (MEDI-0562).

SEQ ID N.º:66 es la cadena pesada del anticuerpo monoclonal agonista OX40 11D4.

SEQ ID N.º:67 es la cadena ligera del anticuerpo monoclonal agonista OX40 11D4.

SEQ ID N.º:68 es la región variable de la cadena pesada (VH) para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 11D4.

SEQ ID N.º:69 es la región variable de cadena ligera (VL) para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 11D4.

SEQ ID N.º:70 es la cadena pesada CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 11D4.

SEQ ID N.º:71 es la cadena pesada CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 11D4.

SEQ ID N.º:72 es la cadena pesada CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 11D4.

SEQ ID N.º:73 es la cadena ligera CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 11D4.

SEQ ID N.º:74 es la cadena ligera CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 11D4.

SEQ ID N.º:75 es la cadena ligera CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 11D4.

SEQ ID N.º:76 es la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:77 es la cadena ligera del anticuerpo monoclonal agonista OX40 18D8.

SEQ ID N.º:78 es la región variable de la cadena pesada (VH) para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 18D8.

SEQ ID N.º:79 es la región variable de cadena ligera (VL) para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 18D8.

SEQ ID N.º:80 es la cadena pesada CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 18D8.

SEQ ID N.º:81 es la cadena pesada CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 18D8.

SEQ ID N.º:82 es la cadena pesada CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 18D8.

SEQ ID N.º:83 es la cadena ligera CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 18D8.

SEQ ID N.º:84 es la cadena ligera CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 18D8.

SEQ ID N.º:85 es la cadena ligera CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 18D8.

SEQ ID N.º:86 es la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal Hu119-122 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:87 es la región variable de cadena ligera (VL) para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

SEQ ID N.º:88 es la cadena pesada CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

SEQ ID N.º:89 es la cadena pesada CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

SEQ ID N.º:90 es la cadena pesada CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

SEQ ID N.º:91 es la cadena ligera CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

SEQ ID N.º:92 es la cadena ligera CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

SEQ ID N.º:93 es la cadena ligera CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

SEQ ID N.º:94 es la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal Hu106-222 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:95 es la región variable de la cadena ligera (VL) para el anticuerpo monoclonal agonista de OX40 Hu106-222.

SEQ ID N.º:96 es la cadena pesada CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

SEQ ID N.º:97 es la cadena pesada CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

SEQ ID N.º:98 es la cadena pesada CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

SEQ ID N.º:99 es la cadena ligera CDR1 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

SEQ ID N.º:100 es la cadena ligera CDR2 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

SEQ ID N.º:101 es la cadena ligera CDR3 para el anticuerpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

SEQ ID N.º:102 es una secuencia de aminoácidos del ligando OX40 (OX40L).

SEQ ID N.º:103 es una porción soluble del polipéptido OX40L.

SEQ ID N.º:104 es una porción soluble alternativa del polipéptido OX40L.

SEQ ID N.º:105 es la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal 008 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:106 es la región variable de la cadena ligera (VL) para el anticuerpo monoclonal 008 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:107 es la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal 011 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:108 es la región variable de la cadena ligera (VL) para el anticuerpo monoclonal 011 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:109 es la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal 021 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:110 es la región variable de la cadena ligera (VL) para el anticuerpo monoclonal 021 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:111 es la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal 023 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:112 es la región variable de la cadena ligera (VL) para el anticuerpo monoclonal 023 agonista de OX40.

SEQ ID N.º:113 es la región variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal agonista OX40.

SEQ ID N.º:114 es la región variable de la cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal agonista OX40.

SEQ ID N.º:115 es la región variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal agonista OX40.

SEQ ID N.º:116 es la región variable de la cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal agonista

OX40.

SEQ ID N.º:117 es la región variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

SEQ ID N.º:118 es la región variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

SEQ ID N.º:119 es la región variable de la cadena ligera (VL) para un anticuerpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

SEQ ID N.º:120 es la región variable de la cadena ligera (VL) para un anticuerpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

SEQ ID N.º:121 es la región variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

SEQ ID N.º:122 es la región variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

SEQ ID N.º:123 es la región variable de la cadena ligera (VL) para un anticuerpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

SEQ ID N.º:124 es la región variable de la cadena ligera (VL) para un anticuerpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

SEQ ID N.º:125 es la región variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal agonista OX40.

SEQ ID N.º:126 es la región variable de la cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal agonista OX40.

SEQ ID N.º:127-462 no están asignados actualmente.

SEQ ID N.º:463 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID N.º:464 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID N.º:465 es la secuencia de aminoácidos de la región variable (V_H) de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID N.º:466 es la secuencia de aminoácidos de la región variable (V_L) de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID N.º:467 es la secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID N.º:468 es la secuencia de aminoácidos CDR2 de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID N.º:469 es la secuencia de aminoácidos CDR3 de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID N.º:470 es la secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID N.º:471 es la secuencia de aminoácidos CDR2 de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID N.º:472 es la secuencia de aminoácidos CDR3 de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID N.º:473 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID N.º:474 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-1

pembrolizumab.

SEQ ID N.º:475 es la secuencia de aminoácidos de la región variable (V_H) de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID N.º:476 es la secuencia de aminoácidos de la región variable (V_L) de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID N.º:477 es la secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID N.º:478 es la secuencia de aminoácidos CDR2 de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID N.º:479 es la secuencia de aminoácidos CDR3 de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID N.º:480 es la secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID N.º:481 es la secuencia de aminoácidos CDR2 de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID N.º:482 es la secuencia de aminoácidos CDR3 de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID N.º:483 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID N.º:484 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID N.º:485 es la secuencia de aminoácidos de la región variable (V_H) de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID N.º:486 es la secuencia de aminoácidos de la región variable (V_L) de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID N.º:487 es la secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID N.º:488 es la secuencia de aminoácidos CDR2 de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID N.º:489 es la secuencia de aminoácidos CDR3 de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID N.º:490 es la secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID N.º:491 es la secuencia de aminoácidos CDR2 de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID N.º:492 es la secuencia de aminoácidos CDR3 de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID N.º:493 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID N.º:494 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID N.º:495 es la secuencia de aminoácidos de la región variable (V_H) de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID N.º:496 es la secuencia de aminoácidos de la región variable (V_L) de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID N.º:497 es la secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1

avelumab.

SEQ ID N.º:498 es la secuencia de aminoácidos CDR2 de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID N.º:499 es la secuencia de aminoácidos CDR3 de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID N.º:500 es la secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID N.º:501 es la secuencia de aminoácidos CDR2 de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID N.º:502 es la secuencia de aminoácidos CDR3 de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID N.º:503 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID N.º:504 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID N.º:505 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID N.º:506 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID N.º:507 es la secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID N.º:508 es la secuencia de aminoácidos CDR2 de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID N.º:509 es la secuencia de aminoácidos CDR3 de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID N.º:510 es la secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID N.º:511 es la secuencia de aminoácidos CDR2 de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID N.º:512 es la secuencia de aminoácidos CDR3 de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Introducción

[0180] La terapia celular adoptiva que utiliza TIL cultivados *ex vivo* mediante el Protocolo de Expansión Rápida (REP) ha producido una terapia celular adoptiva exitosa tras la inmunosupresión del huésped en pacientes con cáncer como el melanoma. Los parámetros actuales de aceptación de la infusión se basan en lecturas de la composición de los TIL (*por ejemplo*, positividad de CD28, CD8, o CD4) y en los pliegues numéricos de expansión y viabilidad del producto REP.

[0181] Los protocolos actuales de REP ofrecen poca información sobre la salud de los TIL que se infundirán al paciente. Las células T experimentan un profundo cambio metabólico durante el curso de su maduración de células T ingenuas a efectoras (véase Chang, et al., Nat. Immunol. 2016, 17, 364, por la presente expresamente incorporado en su totalidad, y en particular para la discusión y marcadores del metabolismo anaeróbico y aeróbico). Por ejemplo, las células T ingenuas dependen de la respiración mitocondrial para producir ATP, mientras que las células T efectoras maduras y sanas, como los TIL, son altamente glucolíticas y dependen de la glucólisis aeróbica para obtener los sustratos bioenergéticos que necesitan para la proliferación, migración, activación, y eficacia antitumoral.

[0182] Los procesos actuales de fabricación y tratamiento de TIL están limitados por la duración, el coste, los problemas de esterilidad, y otros factores descritos en el presente documento, de modo que el potencial para tratar a pacientes

refractarios a anti-PD1 y, como tales, se ha visto gravemente limitado. Existe una necesidad urgente de proporcionar procesos de fabricación de TIL y terapias basadas en dichos procesos que sean apropiadas para su uso en el tratamiento de pacientes para los que quedan muy pocas o ninguna opción de tratamiento viable. La presente invención satisface esta necesidad proporcionando un proceso de fabricación abreviado para su uso en la generación de TILs que luego pueden emplearse en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) que son refractarios al tratamiento anti-PD-1.

[0183] Como se discute *supra,* cualquier divulgación proporcionada en el presente documento relativa a métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia, o métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal, debe considerarse como la divulgación de sustancias o composiciones para su uso en tales métodos.

II. Definiciones

[0184] Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

[0185] Los términos "coadministración", "administrado en combinación con", "administrar en combinación con", "simultáneo", y "concurrente", como se usan en el presente documento, abarcan la administración de dos o más principios farmacéuticos activos (en una realización preferida de la presente invención, por ejemplo, una pluralidad de TIL) a un sujeto de modo que ambos principios farmacéuticos activos y/o sus metabolitos estén presentes en el sujeto al mismo tiempo. La administración conjunta incluye la administración simultánea en composiciones separadas, la administración en momentos diferentes en composiciones separadas o la administración en una composición en la que estén presentes dos o más principios activos farmacéuticos. Se prefiere la administración simultánea en composiciones separadas y la administración en una composición en la que estén presentes ambos agentes.

[0186] El término "*in vivo*" se refiere a un acontecimiento que tiene lugar en el cuerpo de un sujeto.

[0187] El término "*in vitro*" se refiere a un evento que tiene lugar fuera del cuerpo de un sujeto. Los ensayos in vitro abarcan ensayos basados en células en los que se emplean células vivas o muertas y también pueden abarcar un ensayo libre de células en el que no se emplean células intactas.

[0188] El término "*ex vivo*" se refiere a un evento que implica tratar o realizar un procedimiento en una célula, tejido y/u órgano que ha sido extraído del cuerpo de un sujeto. De este modo, la célula, el tejido y/o el órgano pueden devolverse al cuerpo del sujeto en un método de cirugía o tratamiento.

[0189] El término "expansión rápida" significa un aumento en el número de TIL específicos de antígeno de al menos aproximadamente 3 veces (o 4, 5, 6, 7, 8, o 9 veces) durante un periodo de una semana, más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces (o 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90 veces) durante un periodo de una semana, o más preferiblemente al menos aproximadamente 100 veces durante un periodo de una semana. En el presente documento se describen varios protocolos de expansión rápida.

[0190] Por "linfocitos infiltrantes de tumores" o "TIL" se entiende aquí una población de células obtenidas originalmente como glóbulos blancos que han abandonado el torrente sanguíneo de un sujeto y migrado a un tumor. Los TIL incluyen, entre otros, células T citotóxicas $CD8^+$ (linfocitos), células T $CD4^+$ Th1 y Th17, células asesinas naturales, células dendríticas y macrófagos M1. Los TIL incluyen tanto TIL primarios como secundarios. Los "TIL primarios" son los que se obtienen de muestras de tejido del paciente como se describe en el presente documento (a veces denominados "recién recolectados"), y los "TIL secundarios" son cualquier población de células TIL que se haya expandido o proliferado como se describe en el presente documento, incluidos, entre otros, los TIL masivos y los TIL expandidos ("TIL REP" o "TIL post-REP"). Las poblaciones de células TIL pueden incluir TIL modificados genéticamente.

[0191] Por "población de células" (incluyendo TIL) se entiende un número de células que comparten rasgos comunes. En general, las poblaciones suelen oscilar entre 1×10^6 y 1×10^{10} en número, con diferentes poblaciones de TIL que comprenden diferentes números. Por ejemplo, el crecimiento inicial de TIL primarios en presencia de IL-2 da lugar a una población de TIL masivos de aproximadamente 1×10^8 células. La expansión REP se realiza generalmente para proporcionar poblaciones de $1{,}5 \times 10^9$ a $1{,}5 \times 10^{10}$ células para infusión.

[0192] Por "TIL crioconservados" se entiende que los TIL, ya sean primarios, masivos, o expandidos (TIL REP), se tratan y almacenan en un intervalo de -150°C a -60°C aproximadamente. Los métodos generales de crioconservación también se describen en otras partes del presente documento, incluidos los Ejemplos. Para mayor claridad, los "TIL crioconservados" se distinguen de las muestras de tejido congeladas que pueden utilizarse como fuente de TIL primarios.

[0193] Por "TIL crioconservados descongelados" se entiende aquí una población de TIL que se crioconservó previamente y luego se trató para que volviera a temperatura ambiente o superior, incluyendo pero sin limitarse a temperaturas de cultura celular o temperaturas en las que los TIL pueden administrarse a un paciente.

[0194] Los TIL generalmente pueden definirse bioquímicamente, utilizando marcadores de superficie celular, o

funcionalmente, por su capacidad para infiltrarse en tumores y efectuar el tratamiento. Los TIL pueden clasificarse generalmente por la expresión de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1, y CD25. De forma adicional y alternativa, los TIL pueden definirse funcionalmente por su capacidad para infiltrarse en tumores sólidos tras su reintroducción en un paciente.

[0195] El término "medio de criopreservación" o "medio de criopreservación" se refiere a cualquier medio que pueda utilizarse para la criopreservación de células. Dichos medios pueden incluir medios que contengan entre un 7% y un 10% de DMSO. Los medios ejemplares incluyen CryoStor CS10, Hyperthermasol, así como combinaciones de los mismos. El término "CS10" se refiere a un medio de criopreservación que se obtiene de Stemcell Technologies o de Biolife Solutions. El medio CS10 puede denominarse con el nombre comercial "CryoStor® CS10". El medio CS10 es un medio sin suero ni componentes animales que contiene DMSO.

[0196] El término "célula T de memoria central" se refiere a un subconjunto de células T que en el humano son CD45R0+ y expresan constitutivamente CCR7 ($CCR7^{hi}$) y CD62L ($CD62^{hi}$). El fenotipo de superficie de las células T de memoria central también incluye TCR, CD3, CD127 (IL-7R), e IL-15R. Los factores de transcripción de las células T de memoria central incluyen BCL-6, BCL-6B, MBD2, y BMI1. Las células T de memoria central secretan principalmente IL-2 y CD40L como moléculas efectoras tras la activación del TCR. Las células T de memoria central predominan en el compartimento CD4 de la sangre, y en el ser humano están proporcionalmente enriquecidas en los ganglios linfáticos y las amígdalas.

[0197] El término "células T efectoras de memoria" se refiere a un subconjunto de células T humanas o de mamíferos que, al igual que las células T de memoria central, son CD45R0+, pero han perdido la expresión constitutiva de CCR7 ($CCR7^{lo}$) y son heterogéneas o bajas para la expresión de CD62L ($CD62L^{lo}$). El fenotipo de superficie de las células T de memoria central también incluye TCR, CD3, CD127 (IL-7R), e IL-15R. Los factores de transcripción de las células T de memoria central incluyen BLIMP1. Las células T efectoras de memoria secretan rápidamente altos niveles de citocinas inflamatorias tras la estimulación antigénica, incluyendo interferón-γ, IL-4, e IL-5. Las células T efectoras de memoria predominan en el compartimento CD8 de la sangre, y en el ser humano están proporcionalmente enriquecidas en el pulmón, el hígado, y el intestino. Las células T efectoras CD8+ de memoria son portadoras de grandes cantidades de perforina.

[0198] El término "sistema cerrado" se refiere a un sistema que está cerrado al entorno exterior. Cualquier sistema cerrado apropiado para métodos de cultivo celular puede emplearse con los métodos de la presente invención. Los sistemas cerrados incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a los contenedores G cerrados. Una vez que se añade un segmento tumoral al sistema cerrado, éste no se abre al entorno exterior hasta que los TIL están listos para ser administrados al paciente.

[0199] Los términos "fragmentar" y "fragmentado", tal y como se utilizan en el presente documento para describir procesos para desorganizar un tumor, incluyen métodos de fragmentación mecánica como el aplastamiento, el corte en rodajas, la división y la morcelación del tejido tumoral, así como cualquier otro método para desorganizar la estructura física del tejido tumoral.

[0200] Los términos "células mononucleares de sangre periférica" y "PBMCs" se refieren a una célula de sangre periférica que tiene un núcleo redondo, incluyendo linfocitos (células T, células B, células NK) y monocitos. Cuando se utilizan como células presentadoras de antígenos (las PBMC son un tipo de células presentadoras de antígenos), las células mononucleares de sangre periférica son preferiblemente células mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas.

[0201] Los términos "linfocitos de sangre periférica" y "PBLs" se refieren a células T expandidas a partir de sangre periférica. En algunas realizaciones, los PBL se separan de la sangre total o del producto de aféresis de un donante. En algunas realizaciones, los PBL se separan de la sangre total o del producto de aféresis de un donante mediante selección positiva o negativa de un fenotipo de células T, como el fenotipo de células T CD3+ CD45+.

[0202] El término "anticuerpo anti-CD3" se refiere a un anticuerpo o variante del mismo, *por ejemplo,* un anticuerpo monoclonal e incluyendo anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o murinos que se dirigen contra el receptor CD3 del receptor de antígeno de células T maduras. Los anticuerpos anti-CD3 incluyen el OKT-3, también conocido como muromonab. Los anticuerpos anti-CD3 también incluyen el clon UHCT1, también conocido como T3 y CD3ε. Otros anticuerpos anti-CD3 incluyen, por ejemplo, otelixizumab, teplizumab, y visilizumab.

[0203] El término "OKT-3" (también denominado en el presente documento "OKT3") se refiere a un anticuerpo monoclonal o biosimilar o variante del mismo, incluidos anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos, o murinos, dirigidos contra el receptor CD3 del receptor de antígeno de células T maduras, e incluye formas comercialmente disponibles como OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 pure, Miltenyi Biotech, Inc, San Diego, CA, EE.UU.) y muromonab o variantes, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicoformas, o biosimilares de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de muromonab se indican en la Tabla 1 (SEQ ID N.º:1 y SEQ ID N.º:2). Un hibridoma capaz de producir OKT-3 está depositado en la American Type Culture Collection y tiene asignado el número de acceso ATCC CRL 8001. Un hibridoma capaz de producir OKT-3 también está depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares Autentificados (ECACC) y se le ha asignado el número de catálogo 86022706.

TABLA 1. Secuencias de aminoácidos de muromonab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 1:	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY	60
Cadena pesada de Muromonab	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA	120
	KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL	180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRG PKPKSPDKTH TCPPCPAPEL LGG	240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS EDDPDVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300
	STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE	360
	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW	420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	450
SEQ ID N.º 2:	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMHWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH	60
Cadena ligera Muromonab	FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEIKRADT APTVSIFPPS	120
	SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL	180
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	213

[0204] El término "IL-2" (también denominado en el presente documento "IL2") se refiere al factor de crecimiento de células T conocido como interleucina-2, e incluye todas las formas de IL-2, incluidas las formas humanas y de mamíferos, las sustituciones conservadoras de aminoácidos, las glicoformas, los biosimilares, y sus variantes. La IL-2 se describe, *por ejemplo*, en Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88 y Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79. La secuencia de aminoácidos de la IL-2 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se indica en la Tabla 2 (SEQ ID N.º:3). Por ejemplo, el término IL-2 abarca las formas recombinantes humanas de IL-2, como la aldesleucina (PROLEUKIN, disponible comercialmente a través de múltiples proveedores en viales de un solo uso de 22 millones de UI), así como la forma de IL-2 recombinante suministrada comercialmente por CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, EE.UU. (CELLGRO GMP) o ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE.UU. (Cat. N.º CYT-209-b) y otros equivalentes comerciales de otros proveedores. La aldesleucina (des-alanil-1, serina-125 IL-2 humana) es una forma recombinante humana no glucosilada de IL-2 con un peso molecular de aproximadamente 15 kDa. La secuencia de aminoácidos de la aldesleucina adecuada para su uso en la invención se indica en la Tabla 2 (SEQ ID N.º:4). El término IL-2 también abarca las formas pegiladas de IL-2, como se describe en el presente documento, incluido el profármaco pegilado de IL2 NKTR-214, disponible en Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, EE.UU.. El NKTR-214 y la IL-2 pegilada adecuados para su uso en la invención se describen en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2014/0328791 A1 y publicación de solicitud de patente internacional nº WO 2012/065086 Al. Formas alternativas de IL-2 conjugada adecuadas para su uso en la invención se describen en Patentes de EE.UU. N.º 4,766,106, 5,206,344, 5,089,261 y 4902,502. Las formulaciones de IL-2 adecuadas para su uso en la invención se describen en Patente de EE. UU. N.º 6,706,289.

TABLA 2. Secuencias de aminoácidos de las interleucinas.

Identificador	Secuencia (Simbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 3: IL-2 humana recombinante (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
SEQ ID N.º 4: Aldesleucina	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID N.º 5: IL-4 humana recombinante (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID N.º 6: IL-7 humana recombinante (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KDQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 133
SEQ ID N.º 7: IL-15 humana recombinante (rhIL-15)	MRWKKIVGLL GLIIASVSIF YNLVHVTLGV TLKMEGDDAT NCTVNVSDIS KKESDLQSMS IHIGSGLTFL HCGEKNKMAQ EVKISGSGDT	60 115
SEQ ID N.º 8: IL-21 humana recombinante (rhIL-21)	MQGQWSLSHC SICLRLVQLR SVFSDFVHIE LAHDEIFFTF PLAEDVDTCS FQKPKSCLRL FVPIQVTESS NCPSRPGNKS FRHMDCLPSA PEPRAFRKAF EGLLHSHLKL FLSMVAIPTI VSAVNLSPPD	60 120 132

[0205] El término "IL-4" (también referido aquí como "IL4") se refiere a la citocina conocida como interleucina 4, que es producida por células T Th2 y por eosinófilos, basófilos, y mastocitos. La IL-4 regula la diferenciación de las células T ayudantes ingenuas (células Th0) a células T Th2. Steinke y Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70. Tras la activación por IL-4, las células T Th2 producen posteriormente IL-4 adicional en un bucle de retroalimentación positiva. La IL-4 también estimula la proliferación de células B y la expresión del MHC de clase II, e induce el cambio de clase a la expresión de IgE e IgG_1 de las células B. La IL-4 humana recombinante adecuada para su uso en la invención está disponible comercialmente en múltiples proveedores, incluyendo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-211) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante IL-15 humana, Cat. N.º Gibco CTP0043). La secuencia de aminoácidos de la IL-4 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se indica en la Tabla 2 (SEQ ID N.º:5).

[0206] El término "IL-7" (también denominado en el presente documento "IL7") se refiere a una citocina glicosilada derivada de tejidos conocida como interleucina 7, que puede obtenerse de células estromales y epiteliales, así como de células dendríticas. Fry y Mackall,. La IL-7 puede estimular el desarrollo de células T. La IL-7 se une al receptor de IL-7, un heterodímero formado por el receptor alfa de IL-7 y el receptor de cadena gamma común, que en una serie de señales importantes para el desarrollo de las células T dentro del timo y la supervivencia dentro de la periferia. La IL-7 humana recombinante adecuada para su uso en la invención está disponible comercialmente en múltiples proveedores, incluyendo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-254) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante IL-15 humana, Cat. No. Gibco PHC0071). La secuencia de aminoácidos de la IL-7 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se indica en la Tabla 2 (SEQ ID N.º:6).

[0207] El término "IL-15" (también denominado en el presente documento "IL15") se refiere al factor de crecimiento de células T conocido como interleucina-15, e incluye todas las formas de IL-2, incluidas las formas humanas y de mamíferos, las sustituciones conservadoras de aminoácidos, las glicoformas, los biosimilares, y sus variantes. La IL-15 se describe, *por ejemplo*, en Fehniger y Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32. La IL-15 comparte las subunidades β y γ del receptor de señalización con la IL-2. La IL-15 humana recombinante es una cadena polipeptídica única, no glicosilada, que contiene 114 aminoácidos (y una metionina N-terminal) con una masa molecular de 12,8 kDa. La IL-15 humana recombinante está disponible comercialmente en múltiples proveedores, entre ellos ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE.UU. (Cat. No. CYT-230-b) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante IL-15 humana, Cat. N.º 34-8159-82. La secuencia de aminoácidos de la IL-15 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se indica en la Tabla 2 (SEQ ID N.º:7).

[0208] El término "IL-21" (también referido aquí como "IL21") se refiere a la proteína citocina pleiotrópica conocida como

interleucina-21, e incluye todas las formas de IL-21 incluyendo formas humanas y de mamíferos, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicoformas, biosimilares, y variantes de las mismas. La IL-21 se describe, *por ejemplo*, en Spolski y Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95. La IL-21 es producida principalmente por los linfocitos T natural killer y los linfocitos T $CD4^+$ humanos activados. La IL-21 humana recombinante es una cadena polipeptídica única, no glicosilada, que contiene 132 aminoácidos con una masa molecular de 15,4 kDa. La IL-21 humana recombinante está disponible comercialmente en múltiples proveedores, entre ellos ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE.UU. (Cat. No. CYT-408-b) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante IL-21 humana, Cat. N.º 14-8219-80. La secuencia de aminoácidos de la IL-21 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se indica en la Tabla 2 (SEQ ID N.º:8).

[0209] Cuando se indica "una cantidad efectiva antitumoral", "una cantidad efectiva inhibidora de tumores", o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar puede ser determinada por un médico con consideración de las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis, y condición del paciente (sujeto). En general, puede afirmarse que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos infiltrantes tumorales (por ejemplo, TIL secundarios o linfocitos citotóxicos modificados genéticamente) descritos en el presente documento puede administrarse a una dosis de 10^4 a 10^{11} células/kg de peso corporal (por ejemplo, 10^5 a 10^6, 10^5 a 10^{10}, 10^5 a 10^{11}, 10^6 a 10^{10}, 10^6 a 10^{11},10^7 a 10^{11}, 10^7 a 10^{10}, 10^8 a 10^{11}, 10^8 a 10^{10}, 10^9 a 10^{11}, o 10^9 a 10^{10} células/kg de peso corporal), incluyendo todos los valores enteros dentro de dichos intervalos. Las composiciones de linfocitos infiltrantes de tumores (incluidos, en algunos casos, los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente) también pueden administrarse varias veces a estas dosis. Los linfocitos infiltrantes en el tumor (incluidos, en algunos casos, los genéticos) pueden administrarse mediante técnicas de infusión comúnmente conocidas en inmunoterapia (*véase,* por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Un experto en medicina puede determinar fácilmente la dosis y el régimen de tratamiento óptimos para un paciente concreto controlando al paciente en busca de signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

[0210] Los términos "neoplasia hematológica", "neoplasia hematológica" o términos de significado correlativo se refieren a cánceres y tumores de mamíferos de los tejidos hematopoyéticos y linfoides, incluidos, entre otros, los tejidos de la sangre, la médula ósea, los ganglios linfáticos, y el sistema linfático. Las neoplasias hematológicas también se denominan "tumores líquidos". Las neoplasias hematológicas incluyen, entre otras, la leucemia linfoblástica aguda (ALL), el linfoma linfocítico crónico (CLL), el linfoma linfocítico pequeño (SLL), la leucemia mielógena aguda (AML), la leucemia mielógena crónica (CML), la leucemia monocítica aguda (AMoL), el linfoma de Hodgkin, y los linfomas no hodgkinianos. El término "neoplasia hematológica de células B" hace referencia a las neoplasias hematológicas que afectan a las células B.

[0211] El término "tumor líquido" se refiere a una masa anormal de células que es de naturaleza fluida. Los cánceres de tumor líquido incluyen, entre otros, leucemias, mielomas, y linfomas, así como otras neoplasias hematológicas. Los TIL obtenidos de tumores líquidos también pueden denominarse en el presente documento linfocitos infiltrantes de médula ósea (MIL). Los TIL obtenidos de tumores líquidos, incluidos los tumores líquidos que circulan en la sangre periférica, también pueden denominarse en el presente documento PBL. Los términos MIL, TIL, y PBL se utilizan indistintamente en el presente documento y sólo difieren en función del tipo de tejido del que se derivan las células.

[0212] El término "microambiente", tal como se utiliza en el presente documento, puede referirse al microambiente tumoral sólido o hematológico en su conjunto o a un subconjunto individual de células dentro del microambiente. El microambiente tumoral, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una mezcla compleja de "células, factores solubles, moléculas de señalización, matrices extracelulares, y señales mecánicas que promueven la transformación neoplásica, apoyan el crecimiento y la invasión tumoral, protegen al tumor de la inmunidad del huésped, fomentan la resistencia terapéutica y proporcionan nichos para que prosperen las metástasis dominantes", tal y como se describe en Swartz, et al., Cancer Res., 2012, 72, 2473. Aunque los tumores expresan antígenos que deberían ser reconocidos por las células T, la eliminación del tumor por el sistema inmunitario es poco frecuente debido a la supresión inmunitaria por el microentorno.

[0213] Se divulga en el presente documento un método de tratamiento de un cáncer con una población de TIL, donde un paciente se pretrata con quimioterapia no mieloablativa antes de una infusión de TIL según la invención. En algunas realizaciones, la población de TIL puede proporcionarse cuando un paciente es pretratado con quimioterapia no mieloablativa antes de una infusión de TIL según la presente invención. En una realización, la quimioterapia no mieloablativa es ciclofosfamida 60 mg/kg/d durante 2 días (días 27 y 26 antes de la infusión de TIL) y fludarabina 25 mg/m2/d durante 5 días (días 27 a 23 antes de la infusión de TIL). En una realización, tras la quimioterapia no mieloablativa y la infusión de TIL (en el día 0) según la invención, el paciente recibe una infusión intravenosa de IL-2 por vía intravenosa a 720.000 UI/kg cada 8 horas hasta tolerancia fisiológica.

[0214] Los hallazgos experimentales indican que la linfodepleción previa a la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de tumor desempeña un papel clave en la mejora de la eficacia del tratamiento mediante la eliminación de células T reguladoras y elementos competidores del sistema inmunitario ("sumideros de citoquinas"). En consecuencia, algunas realizaciones de la invención utilizan una etapa de linfodepleción (a veces también denominada "acondicionamiento inmunosupresor") en el paciente antes de la introducción de los rTIL de la invención.

[0215] El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto o combinación de compuestos como se describe en el presente documento que es suficiente para efectuar la aplicación

prevista, incluyendo, pero no limitado a, el tratamiento de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar en función de la aplicación prevista (in vitro o in vivo), o del sujeto y la enfermedad que se esté tratando (por ejemplo, el peso, la edad y el sexo del sujeto), la gravedad de la enfermedad, o la forma de administración. El término también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en las células diana (por ejemplo, la reducción de la adhesión de plaquetas y/o la migración celular). La dosis específica variará en función de los compuestos concretos elegidos, el régimen de dosificación a seguir, si el compuesto se administra en combinación con otros compuestos, el momento de la administración, el tejido al que se administra y el sistema físico de administración en el que se transporta el compuesto.

[0216] Los términos "tratamiento", "en tratamiento", "tratar" y similares se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curación parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", tal como se utiliza en el presente documento, abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular en un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a padecerla pero al que aún no se le ha diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo o progresión; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad y/o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad. Por "tratamiento" también se entiende la administración de un agente con el fin de obtener un efecto farmacológico, incluso en ausencia de una enfermedad o afección. Por ejemplo, "tratamiento" abarca la administración de una composición que puede provocar una respuesta inmunitaria o conferir inmunidad en ausencia de una enfermedad, por ejemplo, en el caso de una vacuna.

[0217] El término "heterólogo" cuando se utiliza con referencia a porciones de un ácido nucleico o proteína indica que el ácido nucleico o proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestas para hacer un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificante de otra fuente, o regiones codificantes de diferentes fuentes. Del mismo modo, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

[0218] Los términos "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad", y "porcentaje de identidad de secuencia" (o sinónimos de los mismos, p. ej., "99% idéntico") en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna sustitución conservadora de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse utilizando software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Se conocen en la técnica diversos algoritmos y programas informáticos que pueden utilizarse para obtener alineaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Entre los programas adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias se incluye, por ejemplo, el conjunto de programas BLAST disponible en Sitio web BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Gobierno de los EE.UU.. Las comparaciones entre dos secuencias pueden realizarse mediante el algoritmo BLASTN o BLASTP. BLASTN se utiliza para comparar secuencias de ácidos nucleicos, mientras que BLASTP se utiliza para comparar secuencias de aminoácidos. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o MegAlign, disponibles en DNASTAR, son otros programas informáticos de acceso público que pueden utilizarse para alinear secuencias. Un experto en la técnica puede determinar los parámetros adecuados para una alineación máxima mediante un software de alineación concreto. En ciertas realizaciones, se utilizan los parámetros por defecto del software de alineación.

[0219] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "variante" abarca pero no se limita a anticuerpos o proteínas de fusión que comprenden una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de referencia mediante una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de referencia o adyacentes a la misma. La variante puede incluir una o más sustituciones conservadoras en su secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de referencia. Las sustituciones conservadoras pueden implicar, por ejemplo, la sustitución de aminoácidos cargados o no cargados de forma similar. La variante conserva la capacidad de unirse específicamente al antígeno del anticuerpo de referencia. El término variante también incluye anticuerpos o proteínas pegilados.

[0220] Por "linfocitos infiltrantes tumorales" o "TIL" se entiende aquí una población de células obtenidas originalmente como glóbulos blancos que han abandonado el torrente sanguíneo de un sujeto y migrado a un tumor. Los TIL incluyen, entre otros, células T citotóxicas $CD8^+$ (linfocitos), células T $CD4^+$ Th1 y Th17, células asesinas naturales, células dendríticas y macrófagos M1. Los TIL incluyen tanto TIL primarios como secundarios. Los "TIL primarios" son los que se obtienen a partir de muestras de tejido del paciente como se describe en el presente documento (a veces denominados "recién recolectados"), y los "TIL secundarios" son cualquier población de células TIL que se haya expandido o proliferado como se describe en el presente documento, incluidos, entre otros, los TIL masivos, los TIL expandidos ("TIL REP"), así como los "TIL reREP" como se describe en el presente documento. Los TIL reREP pueden incluir, por ejemplo, TIL de segunda expansión o TIL de segunda expansión adicional (como, por ejemplo, los descritos en la Etapa D de la Figura 8, incluyendo TIL denominados TIL reREP).

[0221] Los TIL generalmente pueden definirse bioquímicamente, utilizando marcadores de superficie celular, o

funcionalmente, por su capacidad para infiltrarse en tumores y efectuar el tratamiento. Los TIL pueden clasificarse generalmente por la expresión de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1, y CD25. Además, y de forma alternativa, los TIL pueden definirse funcionalmente por su capacidad para infiltrarse en tumores sólidos tras su reintroducción en un paciente. Los TIL pueden caracterizarse además por su potencia - por ejemplo, los TIL pueden considerarse potentes si, por ejemplo, la liberación de interferón (IFN) es superior a unos 50 pg/mL, superior a unos 100 pg/mL, superior a unos 150 pg/mL, o superior a unos 200 pg/mL.

[0222] El término "desoxirribonucleótido" abarca desoxirribonucleótidos naturales y sintéticos, modificados y no modificados. Las modificaciones incluyen cambios en la fracción de azúcar, en la fracción de base y/o en los enlaces entre desoxirribonucleótidos en el oligonucleótido.

[0223] El término "ARN" define una molécula que comprende al menos un residuo de ribonucleótido. El término "ribonucleótido" define un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de una fracción de b-D-ribofuranosa. El término ARN incluye el ARN bicatenario, el ARN monocatenario, el ARN aislado como el ARN parcialmente purificado, el ARN esencialmente puro, el ARN sintético, el ARN producido recombinantemente, así como el ARN alterado que difiere del ARN natural por la adición, supresión, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Los nucleótidos de las moléculas de ARN descritas en el presente documento también pueden comprender nucleótidos no estándar, como nucleótidos de origen no natural o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden denominarse análogos o derivados de ARN naturales.

[0224] Los términos "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción e ingredientes inertes. El uso de tales portadores farmacéuticamente aceptables o excipientes farmacéuticamente aceptables para principios farmacéuticos activos es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier portador convencional farmacéuticamente aceptable o excipiente farmacéuticamente aceptable sea incompatible con el principio farmacéutico activo, se contempla su uso en composiciones terapéuticas de la invención. También pueden incorporarse ingredientes farmacéuticos activos adicionales, como otros fármacos, a las composiciones y métodos descritos.

[0225] Los términos "aproximadamente" y "alrededor" significan dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Dicho rango puede estar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro del 50%, más preferiblemente dentro del 20%, más preferiblemente aún dentro del 10%, e incluso más preferiblemente dentro del 5% de un valor o rango dado. La variación admisible que abarcan los términos "aproximadamente" o "alrededor" depende del sistema concreto que se esté estudiando y puede ser apreciada fácilmente por un experto en la técnica. Además, tal como se utilizan en el presente documento, los términos "aproximadamente" y "alrededor" significan que las dimensiones, tamaños, formulaciones, parámetros, formas y otras cantidades y características no son y no necesitan ser exactas, sino que pueden ser aproximadas y/o mayores o menores, según se desee, reflejando tolerancias, factores de conversión, redondeos, errores de medición y similares, y otros factores conocidos por los expertos en la técnica. En general, una dimensión, tamaño, formulación, parámetro, forma u otra cantidad o característica es "alrededor" o "aproximadamente", se indique o no expresamente que lo es. Cabe señalar que las realizaciones de tamaños, formas y dimensiones muy diferentes pueden emplear las disposiciones descritas.

[0226] Los términos transitorios "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en", cuando se utilizan en las reivindicaciones anexas, en su forma original y modificada, definen el alcance de la reivindicación con respecto a qué elementos o etapas adicionales no citados de la reivindicación, si los hubiera, se excluyen del alcance de la reivindicación o reivindicaciones. El término "que comprende" pretende ser inclusivo o abierto y no excluye ningún elemento, método, etapa o material adicional no repetido. El término "compuesto de" excluye cualquier elemento, etapa o material distinto de los especificados en la reivindicación y, en este último caso, las impurezas ordinarias asociadas al material o materiales especificados. El término "que consista esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los elementos, etapas o material(es) especificados y a aquellos que no afecten materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la invención reivindicada. Todas las composiciones, métodos, y kits aquí descritos que encarnan la presente invención pueden, en realizaciones alternativas, definirse más específicamente mediante cualquiera de los términos transitorios "que comprende", "que consiste esencialmente en", y "que consiste en".

[0227] Los términos "anticuerpo" y su forma plural "anticuerpos" se refieren a inmunoglobulinas enteras y a cualquier fragmento de unión a antígeno ("porción de unión a antígeno") o cadenas simples de las mismas. Un "anticuerpo" se refiere además a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de la misma. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera consta de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L de un anticuerpo pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, que se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR), y que pueden intercalarse con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio

de unión que interactúa con uno o varios epítopos de antígenos. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema clásico del complemento.

[0228] El término "antígeno" se refiere a una sustancia que induce una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, un antígeno es una molécula capaz de unirse a un anticuerpo o a un TCR si se presenta mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El término "antígeno", tal y como se utiliza aquí, también engloba los epítopos de células T. Un antígeno es, además, capaz de ser reconocido por el sistema inmunitario. En algunas realizaciones, un antígeno es capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral o una respuesta inmunitaria celular que conduce a la activación de linfocitos B y/o linfocitos T. En algunos casos, esto puede requerir que el antígeno contenga o esté vinculado a un epítopo de células Th. Un antígeno también puede tener uno o más epítopos (por ejemplo, epítopos B- y T-). En algunas realizaciones, un antígeno reaccionará preferiblemente, normalmente de forma muy específica y selectiva, con su anticuerpo o TCR correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos o TCR que pueden ser inducidos por otros antígenos.

[0229] Los términos "anticuerpo monoclonal", "mAb", "composición de anticuerpo monoclonal" o sus formas plurales se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpos monoclonales muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítopo concreto. Los anticuerpos monoclonales específicos para determinados receptores pueden fabricarse utilizando los conocimientos y la destreza en la técnica de inyectar a los sujetos de prueba un antígeno adecuado y a continuación aislar hibridomas que expresen anticuerpos que tengan la secuencia o las características funcionales deseadas. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen proteínas de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá con más detalle a continuación.

[0230] Los términos "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento"), tal como se utilizan aquí, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser desempeñada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Entre los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo se incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente formado por los dominios V_L, V_H, C_L y CH1; (ii) un fragmento F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de anticuerpo de dominio (dAb) (Ward, et al., Nature, 1989, 341, 544-546), que puede consistir en un dominio V_H o un dominio V_L; y (vi) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite fabricarlos como una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv de cadena única (scFv); véanse, *por ejemplo,* Bird, et al.,; y Huston, et al., Proc. Natl.). Dichos anticuerpos scFv también se engloban dentro de los términos "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se analizan para determinar su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

[0231] El término "anticuerpo humano", tal como se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto la estructura como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (*por ejemplo*, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). El término "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como el ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

[0232] El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión y que tienen regiones variables en las que tanto la estructura como las regiones CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, *por ejemplo*, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

[0233] El término "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos

aislados de un animal (tal como un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo (descrito más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, *por ejemplo,* de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante y combinatoria de anticuerpos humanos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas formas de realización, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias Ig humanas, a mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo.*

[0234] Tal como se utiliza en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

[0235] Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan indistintamente en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

[0236] El término "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, incluyendo un conjugado del anticuerpo y otro principio farmacéutico activo o anticuerpo. Los términos "conjugado", "conjugado anticuerpo-fármaco", "ADC", o "inmunoconjugado" se refieren a un anticuerpo, o un fragmento del mismo, conjugado con otra fracción terapéutica, que puede conjugarse con los anticuerpos descritos en el presente documento utilizando métodos disponibles en la técnica.

[0237] Los términos "anticuerpo humanizado", "anticuerpos humanizados" y "humanizado" se refieren a anticuerpos donde secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como el ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Pueden realizarse modificaciones adicionales de la región marco dentro de las secuencias marco humanas. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una 15 región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de entramado (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar aún más el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones, et al., Nature 1986, 321, 522-525; Riechmann, et al., Nature 1988, 332, 323-329; y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 1992, 2, 593-596. Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden modificarse para emplear cualquier variante de Fc que se sepa que imparte una mejora (p. ej., reducción) en la función efectora y/o la unión al FcR. Las variantes Fc pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de las sustituciones de aminoácidos divulgadas en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 1988/07089 A1, WO 1996/14339 A1, WO 1998/05787 A1, WO 1998/23289 A1, WO 1999/51642 A1, WO 99/58572 A1, WO 2000/09560 A2, WO 2000/32767 A1, WO 2000/42072 A2, WO 2002/44215 A2, WO 2002/060919 A2, WO 2003/074569 A2, WO 2004/016750 A2, WO 2004/029207 A2, WO 2004/035752 A2, WO 2004/063351 A2, WO 2004/074455 A2, WO 2004/099249 A2, WO 2005/040217 A2, WO 2005/070963 A1, WO 2005/077981 A2, WO 2005/092925 A2, WO 2005/123780 A2, WO 2006/019447 A1, WO 2006/047350 A2, and WO 2006/085967 A2; y Patentes de EE.UU. N.º 5,648,260; 5,739,277; 5,834,250; 5,869,046; 6,096,871; 6,121,022; 6,194,551; 6,242,195; 6,277,375; 6,528,624; 6,538,124; 6,737,056; 6,821,505; 6,998,253; y 7,083,784.

[0238] El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos en los que las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otra especie, como un anticuerpo donde las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.

[0239] Un "diacuerpo" es un pequeño fragmento de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L o V_L-V_H). Al utilizar un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, la Patente Europea n.º EP 404.097, la Publicación Internacional de Patentes n.º WO 93/11161; y Bolliger, et al., Proc. Natl..

[0240] El término "glicosilación" se refiere a un derivado modificado de un anticuerpo. Un anticuerpo aglicosilado carece de glicosilación. La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que resulten en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del marco de la región variable para eliminar así la glicosilación en ese sitio. La aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno, como se describe en Patentes de EE.UU. N.º 5,714,350 y 6,350,861. Adicional o alternativamente, se puede fabricar un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación, como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos fucosilados o un anticuerpo que tenga estructuras GlcNac bisectantes aumentadas. Se ha demostrado que estos patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Se han descrito en la técnica células con maquinaria de glicosilación alterada que pueden utilizarse como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir así un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de la fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 FUT8-/- se crearon mediante la interrupción dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de sustitución (véase, por ejemplo, Publicación de patente de EE.UU. n.º 2004/0110704 o Yamane-Ohnuki, et al., Biotechnol. Bioeng., 2004, 87, 614-622). Como otro ejemplo, la Patente Europea N.º EP 1.176.195 describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente perturbado, que codifica una fucosil transferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación por reducción o eliminación de la enzima relacionada con el enlace alfa 1,6, y también se describen líneas celulares que tienen una baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tienen la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación de patente internacional WO 03/035835 describe una línea celular CHO variante, las células Lec 13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados con Asn(297), lo que también da lugar a hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields, et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 26733-26740. En la publicación de patente internacional WO 99/54342 se describen líneas celulares diseñadas para expresar glicosiltransferasas modificadoras de glicoproteínas (p. ej., beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas presentan un aumento de las estructuras GlcNac bisecantes, lo que se traduce en un aumento de la actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana, et al., Nat. Biotech. 1999, 17, 176-180). Alternativamente, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden escindirse utilizando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina los residuos de fucosilo de los anticuerpos como se describe en Tarentino, et al., Biochem. 1975, 14, 5516-5523.

[0241] "Pegilación" se refiere a un anticuerpo modificado, o un fragmento del mismo, que típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), como un éster reactivo o un derivado aldehído del PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación puede, por ejemplo, aumentar la vida media biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula reactiva de PEG (o un polímero reactivo hidrosoluble análogo). Tal como se utiliza aquí, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, como mono (C_1-C_{10})alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. El anticuerpo a pegilar puede ser un anticuerpo aglicosilado. Los métodos de pegilación son conocidos en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención, como se describe, por ejemplo, en la patente europea N.º EP 0154316 y EP 0401384 y Patente de EE. UU. N.º 5,824,778.

[0242] El término "biosimilar" se refiere a un producto biológico, incluyendo un anticuerpo monoclonal o proteína, que es altamente similar a un producto biológico de referencia autorizado en EE.UU., a pesar de diferencias menores en componentes clínicamente inactivos, y para el cual no existen diferencias clínicamente significativas entre el producto biológico y el producto de referencia en términos de seguridad, pureza, y potencia del producto. Además, un medicamento biológico similar o "biosimilar" es un medicamento biológico que es similar a otro medicamento biológico cuyo uso ya ha sido autorizado por la Agencia Europea de Medicamentos. El término "biosimilar" también es utilizado como sinónimo por otras agencias reguladoras nacionales y regionales. Los productos biológicos o medicamentos biológicos son medicamentos fabricados o derivados de una fuente biológica, como una bacteria o una levadura. Pueden consistir en moléculas relativamente pequeñas, como la insulina humana o la eritropoyetina, o complejas, como los anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, si la proteína IL-2 de referencia es la aldesleucina (PROLEUKIN), una proteína aprobada por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a la aldesleucina es un "biosimilar de" la aldesleucina o es un "biosimilar del mismo" de la aldesleucina. En Europa, un medicamento biológico similar o "biosimilar" es un medicamento biológico que es similar a otro medicamento biológico cuyo uso ya ha sido autorizado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). La base jurídica pertinente para aplicaciones biológicas similares en Europa es el artículo 6 del Reglamento (EC) n.º 726/2004 y el apartado 4 del artículo 10 de la Directiva 2001/83/EC, en su versión modificada y, por lo tanto, en Europa, el biosimilar puede ser autorizado, aprobado para autorización u objeto de una solicitud de autorización en virtud del artículo 6 del Reglamento (EC) n.º 726/2004 y del apartado 4 del artículo 10 de la Directiva 2001/83/EC. El medicamento biológico original ya autorizado puede denominarse "medicamento de referencia" en Europa. Algunos de los requisitos para que un producto se considere biosimilar se describen en la directriz del CHMP sobre medicamentos biológicos similares. Además, la EMA proporciona directrices específicas para cada producto, incluidas las relativas a los biosimilares de anticuerpos monoclonales, que se publican en su sitio web. Un biosimilar descrito en el

presente documento puede ser similar al medicamento de referencia por sus características de calidad, actividad biológica, mecanismo de acción, perfiles de seguridad y/o eficacia. Además, el biosimilar puede utilizarse o estar destinado a utilizarse para tratar las mismas afecciones que el medicamento de referencia. Por lo tanto, se puede considerar que un biosimilar descrito en el presente documento tiene características de calidad similares o muy similares a las de un medicamento de referencia. Alternativamente, o además, se puede considerar que un biosimilar descrito en el presente documento tiene una actividad biológica similar o muy similar a la de un medicamento de referencia. Alternativamente, o además, se puede considerar que un biosimilar descrito en el presente documento tiene un perfil de seguridad similar o muy similar al de un medicamento de referencia. Alternativamente, o además, se puede considerar que un biosimilar descrito en el presente documento tiene una eficacia similar o muy similar a la de un medicamento de referencia. Como se describe aquí, un biosimilar en Europa se compara con un medicamento de referencia que ha sido autorizado por la EMA. Sin embargo, en algunos casos, el biosimilar puede compararse con un medicamento biológico autorizado fuera del Espacio Económico Europeo (un "comparador" autorizado fuera del EEE) en determinados estudios. Dichos estudios incluyen, por ejemplo, determinados estudios clínicos e in vivo no clínicos. Tal y como se utiliza aquí, el término "biosimilar" también se refiere a un medicamento biológico que ha sido o puede ser comparado con un comparador autorizado no perteneciente al EEE. Algunos biosimilares son proteínas como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, porciones de unión a antígenos) y proteínas de fusión. Un biosimilar de proteína puede tener una secuencia de aminoácidos que presente modificaciones menores en la estructura de aminoácidos (incluyendo, por ejemplo, supresiones, adiciones, y/o sustituciones de aminoácidos) que no afecten significativamente a la función del polipéptido. El biosimilar puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de 97% o superior a la secuencia de aminoácidos de su medicamento de referencia, por ejemplo, 97%, 98%, 99%, o 100%. El biosimilar puede incluir una o más modificaciones postraduccionales, por ejemplo, aunque sin limitarse a ellas, glucosilación, oxidación, desamidación y/o truncamiento que sean diferentes de las modificaciones postraduccionales del medicamento de referencia, siempre que las diferencias no den lugar a un cambio en la seguridad y/o eficacia del medicamento. El biosimilar puede tener un patrón de glicosilación idéntico o diferente al del medicamento de referencia. En particular, aunque no exclusivamente, el biosimilar puede tener un patrón de glicosilación diferente si las diferencias abordan o pretenden abordar problemas de seguridad asociados al medicamento de referencia. Además, el biosimilar puede desviarse del medicamento de referencia en, por ejemplo, su concentración, forma farmacéutica, formulación, excipientes y/o presentación, siempre que la seguridad y eficacia del medicamento no se vean comprometidas. El biosimilar puede presentar diferencias en, por ejemplo, los perfiles farmacocinéticos (PK) y/o farmacodinámicos (PD) en comparación con el medicamento de referencia, pero aún así se considera lo suficientemente similar al medicamento de referencia como para ser autorizado o considerado apto para su autorización. En determinadas circunstancias, el biosimilar presenta diferentes características de unión en comparación con el medicamento de referencia, en las que una Autoridad Reguladora, como la EMA, considera que las diferentes características de unión no son un obstáculo para su autorización como producto biológico similar. El término "biosimilar" también es utilizado como sinónimo por otras agencias reguladoras nacionales y regionales.

III. Procesos de Fabricación TIL - 2A

[0243] Un proceso TIL ejemplar conocido como proceso 2A que contiene algunas de estas características se representa en la Figura 2, y algunas de las ventajas de esta realización de la presente invención sobre el proceso 1C se describen en las Figuras F y G. En la Figura 1 se muestra una realización del proceso 2A.

[0244] Como se discute en el presente documento, el presente método puede incluir una etapa relacionada con la reestimulación de TIL criopreservados para aumentar su actividad metabólica y por lo tanto la salud relativa antes del trasplante a un paciente, y métodos para probar dicha salud metabólica. Como se describe en general en el presente documento, los TIL se toman generalmente de una muestra del paciente y se manipulan para aumentar su número antes del trasplante a un paciente. En algunas realizaciones, los TIL pueden ser opcionalmente manipulados genéticamente como se discute a continuación.

[0245] En algunas realizaciones, los TIL pueden criopreservarse. Una vez descongelados, también pueden volver a estimularse para aumentar su metabolismo antes de la infusión en un paciente.

[0246] En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, la primera expansión (incluyendo procesos referidos como el preREP así como procesos mostrados en la Figura 1 como Etapa A) se acorta a 3 a 14 días y la segunda expansión (incluyendo procesos referidos como el REP así como procesos mostrados en la Figura 1 como la Etapa B) se acorta a 7 a 14 días, como se discute en detalle a continuación así como en los ejemplos y figuras. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, la primera expansión (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1) se acorta a 11 días y la segunda expansión (por ejemplo, una expansión como la descrita en la Etapa D en la Figura 1) se acorta a 11 días. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, la combinación de la primera expansión y la segunda expansión (por ejemplo, las expansiones descritas como Etapa B y Etapa D en la Figura 1) se acorta a 22 días, como se discute en detalle a continuación y en los ejemplos y figuras.

[0247] Las designaciones de "Etapa" A, B, C, *etc.,* a continuación son en referencia a la Figura 1 y en referencia a ciertas realizaciones aquí descritas. El orden de las etapas a continuación y en la Figura 1 es ejemplar y cualquier combinación u orden de etapas, así como etapas adicionales, repetición de etapas y/u omisión de etapas se contempla en la presente

solicitud y en los métodos aquí divulgados.

A. ETAPA A: Obtener una muestra del tumor del paciente

[0248] En general, los TIL se obtienen inicialmente de una muestra de tumor de paciente ("TIL primarios") y luego se expanden en una población más grande para manipulación adicional como se describe en el presente documento, opcionalmente criopreservados, reestimulados como se describe en el presente documento y opcionalmente evaluados para fenotipo y parámetros metabólicos como una indicación de la salud de TIL.

[0249] Una muestra tumoral del paciente puede obtenerse utilizando métodos conocidos en la técnica, generalmente mediante resección quirúrgica, biopsia con aguja, biopsia de núcleo, biopsia pequeña, u otros medios para obtener una muestra que contenga una mezcla de células tumorales y células TIL. En algunas realizaciones, se utiliza el muestreo multilesional. En algunas realizaciones, la resección quirúrgica, la biopsia con aguja, la biopsia con aguja gruesa, la biopsia pequeña, u otros medios para obtener una muestra que contenga una mezcla de células tumorales y células TIL incluyen el muestreo multilesional (*es decir,* la obtención de muestras de uno o más focos tumorales y/o localizaciones en el paciente, así como de uno o más tumores en la misma localización o en estrecha proximidad). En general, la muestra tumoral puede proceder de cualquier tumor sólido, incluidos tumores primarios, tumores invasivos o tumores metastásicos. En algunas realizaciones, los TIL útiles se obtienen a partir de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

[0250] Una vez obtenida, la muestra tumoral es generalmente fragmentada usando disección aguda en pequeños pedazos de entre 1 a aproximadamente 8 mm^3, siendo particularmente útil de aproximadamente 2-3 mm^3. Los TIL se cultivan a partir de estos fragmentos utilizando digestiones tumorales enzimáticas. Tales digestiones tumorales pueden producirse por incubación en medios enzimáticos (*por ejemplo*, tampón 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), 2 mM de glutamato, 10 mcg/mL de gentamicina, 30 unidades/mL de DNasa y 1,0 mg/mL de colagenasa) seguida de disociación mecánica (*por ejemplo*, utilizando un disociador tisular). Los digeridos tumorales pueden producirse colocando el tumor en medios enzimáticos y disociando mecánicamente el tumor durante aproximadamente 1 minuto, seguido de incubación durante 30 minutos a 37 °C en 5% de CO_2, seguido de ciclos repetidos de disociación mecánica e incubación en las condiciones anteriores hasta que sólo queden pequeños trozos de tejido. Al final de este proceso, si la suspensión celular contiene un gran número de glóbulos rojos o células muertas, se puede realizar una separación en gradiente de densidad utilizando polisacárido hidrófilo ramificado FICOLL para eliminar estas células. Pueden utilizarse métodos alternativos conocidos en la técnica, como los descritos en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2012/0244133 A1. Cualquiera de los métodos anteriores puede utilizarse en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento para métodos de expansión de TIL o métodos de tratamiento de un cáncer.

[0251] Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones, los TIL se derivan de tumores sólidos. Los tumores sólidos pueden no fragmentarse. Los tumores sólidos pueden no estar fragmentados y se someten a digestión enzimática como tumores enteros. Los tumores pueden digerirse en una mezcla enzimática que comprenda colagenasa, DNasa, e hialuronidasa. Los tumores pueden digerirse en una mezcla enzimática compuesta por colagenasa, DNasa, e hialuronidasa durante 1-2 horas. Los tumores pueden digerirse en una mezcla enzimática que comprenda colagenasa, DNasa, e hialuronidasa durante 1-2 horas a 37°C, 5% CO_2. Los tumores pueden digerirse en una mezcla enzimática que comprenda colagenasa, DNasa, e hialuronidasa durante 1-2 horas a 37°C, 5% CO_2 con rotación. Los tumores pueden digerirse durante la noche con rotación constante. Los tumores pueden digerirse durante la noche a 37°C, 5% CO_2 con rotación constante. El tumor entero puede combinarse con las enzimas para formar una mezcla de reacción de digestión tumoral.

[0252] El tumor puede reconstituirse con las enzimas liofilizadas en un tampón estéril. En algunas realizaciones, el tampón es HBSS estéril.

[0253] La mezcla de enzimas puede comprender colagenasa. La colagenasa puede ser colagenasa IV. El caldo de trabajo para la colagenasa puede ser un caldo de trabajo 10X de 100 mg/ml.

[0254] La mezcla enzimática puede comprender ADNasa. El caldo de trabajo para la ADNasa puede ser un caldo de trabajo 10X de 10.000 UI/ml.

[0255] La mezcla enzimática puede comprender hialuronidasa. En algunas realizaciones, el caldo de trabajo para la hialuronidasa es un caldo de trabajo 10-mg/ml 10X.

[0256] La mezcla enzimática puede comprender 10 mg/ml de colagenasa, 1000 UI/ml de ADNasa y 1 mg/ml de hialuronidasa.

[0257] La mezcla enzimática puede comprender 10 mg/ml de colagenasa, 500 UI/ml de ADNasa y 1 mg/ml de hialuronidasa.

[0258] En general, la suspensión celular recolecciónda se denomina "población celular primaria" o población celular "recién recolecciónda".

[0259] En algunas realizaciones, la fragmentación incluye fragmentación física, incluyendo por ejemplo, disección así como digestión. En algunas realizaciones, la fragmentación es física. En algunas realizaciones, la fragmentación es disección. En algunas realizaciones, la fragmentación es por digestión. En algunas realizaciones, los TIL pueden cultivarse inicialmente a partir de digestiones enzimáticas de tumores y fragmentos de tumores obtenidos de pacientes. En una realización, los TIL pueden cultivarse inicialmente a partir de digestiones enzimáticas de tumores y fragmentos de tumores obtenidos de pacientes.

[0260] En algunas realizaciones, donde el tumor es un tumor sólido, el tumor se somete a fragmentación física después de que la muestra del tumor se obtiene en, por ejemplo, la Etapa A (como se proporciona en la Figura 1). En algunas realizaciones, la fragmentación se produce antes de la criopreservación. En algunas realizaciones, la fragmentación se produce después de la criopreservación. En algunas realizaciones, la fragmentación se produce tras la obtención del tumor y en ausencia de criopreservación. En algunas realizaciones, el tumor se fragmenta y se colocan 10, 20, 30, 40 o más fragmentos o piezas en cada contenedor para la primera expansión. En algunas realizaciones, el tumor se fragmenta y se colocan 30 o 40 fragmentos o piezas en cada contenedor para la primera expansión. En algunas realizaciones, el tumor se fragmenta y se colocan 40 fragmentos o piezas en cada contenedor para la primera expansión. En algunas realizaciones, los fragmentos múltiples comprenden de unos 4 a unos 50 fragmentos, donde cada fragmento tiene un volumen de unos 27 mm^3. En algunas realizaciones, los fragmentos múltiples comprenden de unos 30 a unos 60 fragmentos con un volumen total de unos 1300 mm^3 a unos 1500 mm^3. En algunas realizaciones, los fragmentos múltiples comprenden unos 50 fragmentos con un volumen total de unos 1350 mm^3. En algunas realizaciones, los fragmentos múltiples comprenden unos 50 fragmentos con una masa total de entre 1 gramo y 1,5 gramos. En algunas realizaciones, los fragmentos múltiples comprenden aproximadamente 4 fragmentos.

[0261] En algunas realizaciones, los TIL se obtienen a partir de fragmentos tumorales. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral se obtiene mediante disección cortante. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene entre 1 mm^3 y 10 mm^3 aproximadamente. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene entre 1 mm^3 y 8 mm^3 aproximadamente. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 1 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 2 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 3 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 4 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 5 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 6 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 7 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 8 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 9 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 10 mm^3. En algunas realizaciones, los tumores miden 1-4 mm × 1-4 mm × 1-4 mm. En algunas realizaciones, los tumores miden 1 mm × 1 mm × 1 mm. En algunas realizaciones, los tumores miden 2 mm × 2 mm × 2 mm. En algunas realizaciones, los tumores miden 3 mm × 3 mm × 3 mm. En algunas realizaciones, los tumores miden 4 mm × 4 mm × 4 mm.

[0262] En algunas realizaciones, los tumores se resecan para minimizar la cantidad de tejidos hemorrágicos, necróticos, y/o grasos en cada pieza. En algunas realizaciones, los tumores se resecan para minimizar la cantidad de tejido hemorrágico en cada pieza. En algunas realizaciones, los tumores se resecan para minimizar la cantidad de tejido necrótico en cada pieza. En algunas realizaciones, los tumores se resecan para minimizar la cantidad de tejido adiposo en cada pieza.

[0263] En algunas realizaciones, la fragmentación del tumor se lleva a cabo para mantener la estructura interna del tumor. En algunas realizaciones, la fragmentación del tumor se lleva a cabo sin realizar previamente un movimiento de aserrado con un bisturí. En algunas realizaciones, los TIL se obtienen a partir de digestiones tumorales. En algunas realizaciones, los digeridos tumorales se generaron por incubación en medios enzimáticos, por ejemplo pero no limitados a RPMI 1640, 2 mM GlutaMAX, 10 mg/mL de gentamicina, 30 U/mL de DNasa, y 1,0 mg/mL de colagenasa, seguido de disociación mecánica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Tras colocar el tumor en un medio enzimático, se puede disociar mecánicamente durante aproximadamente 1 minuto. A continuación, se puede incubar la solución durante 30 minutos a 37 °C en un 5% de CO_2 y se vuelve a disgregar mecánicamente durante aproximadamente 1 minuto. Tras incubarlo de nuevo durante 30 minutos a 37 °C en un 5% de CO_2, el tumor puede disgregarse mecánicamente por tercera vez durante aproximadamente 1 minuto. En algunas realizaciones, después de la tercera disociación mecánica, si había trozos grandes de tejido, se aplicaron 1 ó 2 disociaciones mecánicas adicionales a la muestra, con o sin 30 minutos adicionales de incubación a 37 °C en 5% de CO_2. En algunas realizaciones, al final de la incubación final, si la suspensión celular contiene un gran número de glóbulos rojos o células muertas, se puede realizar una separación en gradiente de densidad utilizando Ficoll para eliminar estas células.

[0264] En algunas realizaciones, la suspensión celular recoleccióndа antes del primer etapa de expansión se denomina "población celular primaria" o población celular "recién recoleccióndа".

[0265] En algunas realizaciones, las células pueden ser opcionalmente congeladas después de la recolección de la muestra y almacenadas congeladas antes de la entrada en la expansión descrita en la Etapa B, que se describe con más detalle a continuación, así como se ejemplifica en la Figura 1.

B. ETAPA B: Primera Ampliación

[0266] En algunas realizaciones, los métodos presentes proporcionan para obtener TILs jóvenes, que son capaces de ciclos de replicación aumentados sobre la administración a un sujeto/paciente y como tal pueden proporcionar beneficios terapéuticos adicionales sobre TILs más viejos (*es decir,* TILs que han experimentado más rondas de replicación antes de la administración a un sujeto/paciente). Las características de los TIL jóvenes se han descrito en la literatura, por ejemplo Donia, at 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.,; Shen et al., J Immunother, 30:123-129 (2007); Zhou, et al., J Immunother, 28:53-62 (2005); y Tran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008).

[0267] Los diversos receptores de antígenos de los linfocitos T y B se producen por recombinación somática de un número limitado, pero grande, de segmentos génicos. Estos segmentos de genes: V (variable), D (diversidad), J (unión), y C (constante), determinan la especificidad de unión y las aplicaciones posteriores de las inmunoglobulinas y los receptores de células T (TCR). La presente invención proporciona un método para generar TILs que exhiben y aumentan la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos por el presente método muestran un aumento de la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, las células TIL obtenidas por el presente método muestran un aumento en la diversidad del repertorio de células T en comparación con las células TIL recién recolecciónda s y/o las células TIL preparadas usando otros métodos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, métodos distintos de los representados en la Figura 1. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos por el presente método muestran un aumento en la diversidad del repertorio de células T en comparación con los TIL recién recolecciónd os y/o los TIL preparados utilizando métodos a los que se hace referencia como proceso 1C, como se ejemplifica en la Figura 5 y/o la Figura 6. En algunas realizaciones, las células TIL obtenidas en la primera expansión muestran un aumento de la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, el aumento de la diversidad es un aumento de la diversidad de inmunoglobulinas y/o de la diversidad de receptores de células T. En algunas realizaciones, la diversidad está en la inmunoglobulina está en la cadena pesada de la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la diversidad está en la inmunoglobulina está en la cadena ligera de la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la diversidad está en el receptor de células T. En algunas realizaciones, la diversidad está en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma, y delta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) alfa. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión de TCRab *(es decir,* TCRα/β).

[0268] Después de la disección o digestión de fragmentos tumorales, por ejemplo como se describe en la Etapa A de la Figura 1, las células resultantes se cultivan en suero que contiene IL-2 bajo condiciones que favorecen el crecimiento de TILs sobre el tumor y otras células. En algunas realizaciones, los digeridos tumorales se incuban en pocillos de 2 mL en medios que comprenden suero AB humano inactivado con 6000 UI/mL de IL-2. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, esta población de células primarias se cultiva durante un periodo de días, generalmente de 3 a 14 días, dando como resultado una población TIL masiva, generalmente alrededor de 1×10^8 células TIL masivas. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, esta población de células primarias se cultiva durante un periodo de 7 a 14 días, dando como resultado una población de TIL masiva, generalmente alrededor de 1×10^8 células TIL masivas. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, esta población de células primarias se cultiva durante un periodo de 10 a 14 días, dando como resultado una población de TIL masiva, generalmente alrededor de 1×10^8 células TIL masivas. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, esta población de células primarias se cultiva durante un periodo de aproximadamente 11 días, lo que da como resultado una población de TIL masiva, generalmente aproximadamente 1×10^8 células TIL masivas.

[0269] En una realización preferida, la expansión de TILs puede realizarse utilizando una etapa de expansión de TIL masiva inicial (por ejemplo como los descritos en la Etapa B de la Figura 1, que puede incluir procesos denominados pre-REP) como se describe a continuación y en el presente documento, seguido de una segunda expansión (Etapa D, incluyendo procesos denominados etapas de protocolo de expansión rápida (REP)) como se describe a continuación en la Etapa D y en el presente documento, seguido de criopreservación opcional, y seguido de una segunda Etapa D (incluyendo procesos denominados etapas de re-estimulación REP) como se describe a continuación y en el presente documento. Los TIL obtenidos de este proceso pueden caracterizarse opcionalmente para características fenotípicas y parámetros metabólicos como se describe en el presente documento.

[0270] En las realizaciones en las que los cultivos de TIL se inician en placas de 24 pocillos, por ejemplo, utilizando el grupo de cultivo celular Costar de 24 pocillos, fondo plano (Corning Incorporated, Corning, NY, cada pocillo puede sembrarse con 1×10^6 células de digestión tumoral o un fragmento tumoral en 2 mL de medio completo (CM) con IL-2 (6000 UI/mL; Chiron Corp., Emeryville, CA). En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene entre 1 mm^3 y 10 mm^3 aproximadamente.

[0271] En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión se denomina "CM", una abreviatura de medio de cultivo. En algunas realizaciones, el CM para la Etapa B consiste en RPMI 1640 con GlutaMAX, suplementado con 10% de suero AB humano, 25 mM de Hepes, y 10 mg/mL de gentamicina. En las realizaciones en las que los cultivos se inician en matraces permeables al gas con una capacidad de 40 mL y un fondo de silicona permeable al gas de 10 cm^2

(por ejemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Fig. 1), cada matraz se cargó con 10-40 × 10^6 células viables de digestión tumoral o 5-30 fragmentos tumorales en 10-40 mL de CM con IL-2. Tanto las placas G-Rex10 como las de 24 pocillos se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C con un 5% de CO_2 y, 5 días después del inicio del cultivo, se retiró la mitad de los medios y se sustituyeron por CM e IL-2 frescos y, después del día 5, se cambió la mitad de los medios cada 2-3 días.

[0272] Después de la preparación de los fragmentos tumorales, las células resultantes (*es decir, los* fragmentos) se cultivan en suero que contiene IL-2 bajo condiciones que favorecen el crecimiento de TILs sobre el tumor y otras células. En algunas realizaciones, los digeridos tumorales se incuban en pocillos de 2 mL en medios que comprenden suero AB humano inactivado (o, en algunos casos, como se describe en el presente documento, en presencia de una población de células aAPC) con 6000 UI/mL de IL-2. Esta población celular primaria se cultiva durante un periodo de días, generalmente de 10 a 14 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente alrededor de 1×10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, los medios de crecimiento durante la primera expansión comprenden IL-2 o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la IL es IL-2 humana recombinante (rhIL-2). En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 20-30×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 20×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 25×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 30×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL- 2 tiene una concentración final de 4-8×10^6 UI/mg de IL-2. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una concentración final de 5-7×10^6 UI/mg de IL-2. En algunas realizaciones, la solución madre de IL- 2 tiene una concentración final de 6×10^6 UI/mg de IL-2. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 se prepara como se describe en el Ejemplo 5. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 10.000 UI/mL de IL-2, alrededor de 9.000 UI/mL de IL-2, alrededor de 8.000 UI/mL de IL-2, alrededor de 7.000 UI/mL de IL-2, alrededor de 6.000 UI/mL de IL-2 o alrededor de 5.000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 9.000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 5.000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de unos 8.000 UI/mL de IL-2 a unos 6.000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 7.000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 6.000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 6.000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En una realización preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 1000 UI/mL, alrededor de 1500 UI/mL, alrededor de 2000 UI/mL, alrededor de 2500 UI/mL, alrededor de 3000 UI/mL, alrededor de 3500 UI/mL, alrededor de 4000 UI/mL, alrededor de 4500 UI/mL, alrededor de 5000 UI/mL, alrededor de 5500 UI/mL, alrededor de 6000 UI/mL, alrededor de 6500 UI/mL, alrededor de 7000 UI/mL, alrededor de 7500 UI/mL, o alrededor de 8000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 1000 y 2000 UI/mL, entre 2000 y 3000 UI/mL, entre 3000 y 4000 UI/mL, entre 4000 y 5000 UI/mL, entre 5000 y 6000 UI/mL, entre 6000 y 7000 UI/mL, entre 7000 y 8000 UI/mL, o alrededor de 8000 UI/mL de IL-2.

[0273] En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 500 UI/mL de IL-15, alrededor de 400 UI/mL de IL-15, alrededor de 300 UI/mL de IL-15, alrededor de 200 UI/mL de IL-15, alrededor de 180 UI/mL de IL-15, alrededor de 160 UI/mL de IL-15, alrededor de 140 UI/mL de IL-15, alrededor de 120 UI/mL de IL-15, o alrededor de 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 500 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 400 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 300 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 200 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-15. En una realización preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15.

[0274] En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 20 UI/mL de IL-21, alrededor de 15 UI/mL de IL-21, alrededor de 12 UI/mL de IL-21, alrededor de 10 UI/mL de IL-21, alrededor de 5 UI/mL de IL-21, alrededor de 4 UI/mL de IL-21, alrededor de 3 UI/mL de IL-21, alrededor de 2 UI/mL de IL-21, alrededor de 1 UI/mL de IL-21, o alrededor de 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 20 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 15 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 12 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 10 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende entre aproximadamente 5 UI/mL de IL-21 y aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 2 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-21. En una realización preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21.

[0275] El medio de cultivo celular comprende el anticuerpo OKT-3. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 30 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,1 ng/ml, aproximadamente 0,5 ng/ml, aproximadamente 1 ng/ml, aproximadamente 2,5 ng/ml, aproximadamente 5 ng/ml, aproximadamente 7,5 ng/ml, aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 15 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 25 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml, aproximadamente 35 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 70 ng/ml, aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 90 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, y aproximadamente 1 µg/ml del anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 0,1 ng/mL y 1 ng/mL, entre 1 ng/mL y 5 ng/mL, entre 5 ng/mL y 10 ng/mL, entre 10 ng/mL y 20 ng/mL, entre 20 ng/mL y 30 ng/mL, entre 30 ng/mL y 40 ng/mL, entre 40 ng/mL y 50 ng/mL, y entre 50 ng/mL y 100 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En algunas realizaciones, el anticuerpo OKT-3 es muromonab.

TABLA 3: Secuencias de aminoácidos de muromonab (anticuerpo OKT-3 ejemplar)

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 1: Cadena pesada de Muromonab	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRG PKPKSPDKTH TCPPCPAPEL LGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID N.º 2: Cadena ligera Muromonab	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMHWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

[0276] En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende uno o más agonistas del TNFRSF en un medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF comprende un agonista del 4-1BB. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF es un agonista 4-1BB, y el agonista 4-1BB se selecciona del grupo que consiste en urelumab, utomilumab, EU-101, una proteína de fusión, y fragmentos, derivados, variantes, biosimilares y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF se añade a una concentración suficiente para alcanzar una concentración en el medio de cultivo celular de entre 0,1 µg/mL y 100 µg/mL. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF se añade a una concentración suficiente para alcanzar una concentración en el medio de cultivo celular de entre 20 µg/mL y 40 µg/mL.

[0277] En algunas realizaciones, además de uno o más agonistas del TNFRSF, el medio de cultivo celular comprende además IL-2 a una concentración inicial de aproximadamente 3000 UI/mL y anticuerpo OKT-3 a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/mL, y en donde el uno o más agonistas del TNFRSF comprende un agonista 4-1BB.

[0278] En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión se denomina "CM", una abreviatura de medio de cultivo. En algunas realizaciones, se denomina CM1 (medio de cultivo 1). En algunas realizaciones, el CM consiste en RPMI 1640 con GlutaMAX, suplementado con 10% de suero AB humano, 25 mM de Hepes y 10 mg/mL de gentamicina. En las realizaciones en las que los cultivos se inician en matraces permeables al gas con una capacidad de 40 mL y un fondo de silicona permeable al gas de 10cm^2 (por ejemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Fig. 1), cada matraz se cargó con 10-40×10^6 células viables de digestión tumoral o 5-30 fragmentos tumorales en 10-40mL de CM con IL-2. Tanto las placas G-Rex10 como las de 24 pocillos se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C con un 5% de CO_2 y, 5 días después del inicio del cultivo, se retiró la mitad de los medios y se sustituyeron por CM e IL-2 frescos y, después del día 5, se cambió la mitad de los medios cada 2-3 días. En algunas realizaciones, el CM es el CM1 descrito en los Ejemplos, *véase,* Ejemplo 1. En algunas realizaciones, la primera expansión se produce en un medio de cultivo celular inicial o en un primer medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular inicial o el primer medio de cultivo celular comprende IL-2.

[0279] En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, el proceso de primera expansión (incluyendo procesos como por ejemplo los descritos en la Etapa B de la Figura 1, que pueden incluir los que

a veces se denominan pre-REP) se acorta a 3-14 días, como se discute en los ejemplos y figuras. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, la primera expansión (incluyendo procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1, que pueden incluir los que a veces se denominan pre-REP) se acorta a 7 a 14 días, como se discute en los Ejemplos y se muestra en las Figuras 4 y 5, además de incluir, por ejemplo, una expansión como la descrita en la Etapa B de la Figura 1. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, la primera expansión de la Etapa B se acorta a 10-14 días. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, la primera expansión se acorta a 11 días, como se discute en, por ejemplo, una expansión como la descrita en la Etapa B de la Figura 1.

[0280] En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, u 8 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 1 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 2 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 3 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 4 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 5 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 6 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 7 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 8 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 9 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 10 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 11 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 12 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 13 y 14 días. La primera expansión de TIL puede durar durante 14 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 1 y 11 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 2 y 11 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 3 y 11 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 4 y 11 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 5 y 11 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 6 y 11 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 7 y 11 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 8 y 11 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 9 y 11 días. La primera expansión de TIL puede durar entre 10 y 11 días. La primera expansión de TIL puede durar durante 11 días.

[0281] En algunas realizaciones, se emplea una combinación de IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21 durante la primera expansión. En algunas realizaciones, IL-2, IL-7, IL-15, y/o IL-21, así como cualquier combinación de las mismas, pueden incluirse durante la primera expansión, incluyendo, por ejemplo, durante un proceso de la Etapa B según la Figura 1, así como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea una combinación de IL-2, IL-15, e IL-21 durante la primera expansión. En algunas realizaciones, la IL-2, la IL-15 y la IL-21, así como cualquier combinación de las mismas, pueden incluirse durante los procesos de la Etapa B según la Figura 1 y como se describe en el presente documento.

[0282] En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, el proceso de primera expansión (incluyendo procesos denominados pre-REP; por ejemplo, la Etapa B según la Figura 1) se acorta de 3 a 14 días, como se discute en los ejemplos y figuras. En la divulgación proporcionada en el presente documento pero no reivindicada, la primera expansión de la Etapa B se acorta de 7 a 14 días. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, la primera expansión de la Etapa B se acorta a 10 a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión se acorta a 11 días.

[0283] En algunas realizaciones, la primera expansión, por ejemplo, la Etapa B según la Figura 1, se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea un único biorreactor. En algunas realizaciones, el biorreactor único empleado es, por ejemplo, un G-REX -10 o un G-REX -100. En algunas realizaciones, el biorreactor de sistema cerrado es un único biorreactor.

C. ETAPA C: Transición de la primera a la segunda ampliación

[0284] En algunos casos, la población de TIL a granel obtenida de la primera expansión, incluyendo por ejemplo la población de TIL obtenida de, por ejemplo, la Etapa B como se indica en la Figura 1, puede criopreservarse inmediatamente, usando los protocolos que se discuten a continuación. Alternativamente, la población de TIL obtenida de la primera expansión, denominada segunda población de TIL, puede someterse a una segunda expansión (que puede incluir expansiones denominadas a veces REP) y luego criopreservarse como se expone más adelante. Del mismo modo, en el caso de que se vayan a utilizar TIL modificados genéticamente en la terapia, la primera población TIL (a veces denominada población TIL masiva) o la segunda población TIL (que en algunas realizaciones puede incluir poblaciones denominadas poblaciones TIL REP) pueden someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados antes de la expansión o después de la primera expansión y antes de la segunda expansión.

[0285] En algunas realizaciones, los TIL obtenidos de la primera expansión (por ejemplo, de la Etapa B como se indica en la Figura 1) se almacenan hasta que se fenotipan para la selección. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos de la primera expansión (por ejemplo, de la Etapa B como se indica en la Figura 1) no se almacenan y se procede directamente a la segunda expansión. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos de la primera expansión no se criopreservan después de la primera expansión y antes de la segunda. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda expansión se produce aproximadamente a los 3 días, 4, días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, o 14 días desde que se produce la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 3 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 4 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 4 y 10

días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 7 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda expansión se produce a los 14 días aproximadamente desde que se produce la fragmentación.

[0286] En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, o 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 1 día y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 2 a 14 días. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 3 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 4 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 5 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 6 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 7 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 8 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 9 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 10 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 11 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 12 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 13 y 14 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce a los 14 días de producirse la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 1 día y 11 días desde que se produce la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 2 días y 11 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 3 y 11 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 4 y 11 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 5 y 11 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 6 y 11 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 7 y 11 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 8 y 11 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 9 y 11 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce entre 10 y 11 días después de que se produzca la fragmentación. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda se produce 11 días después de que se produzca la fragmentación.

[0287] En algunas realizaciones, los TIL no se almacenan después de la primera expansión y antes de la segunda expansión, y los TIL proceden directamente a la segunda expansión (por ejemplo, en algunas realizaciones, no hay almacenamiento durante la transición de la Etapa B al Etapa D como se muestra en la Figura 1). En algunas realizaciones, la transición se produce en un sistema cerrado, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los TIL de la primera expansión, la segunda población de TIL, pasa directamente a la segunda expansión sin periodo de transición.

[0288] En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión a la segunda expansión, por ejemplo, la Etapa C según la Figura 1, se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea un único biorreactor. En algunas realizaciones, el biorreactor único empleado es, por ejemplo, un G-REX -10 o un G-REX -100. En algunas realizaciones, el biorreactor de sistema cerrado es un único biorreactor.

1. Citocinas

[0289] Los métodos de expansión aquí descritos generalmente utilizan medios de cultivo con altas dosis de una citoquina, en particular IL-2, como es conocido en la técnica.

[0290] Alternativamente, el uso de combinaciones de citoquinas para la expansión rápida y/o segunda expansión de TILS es adicionalmente posible, con combinaciones de dos o más de IL-2, IL-15 e IL-21 como se describe generalmente en la Publicación Internacional N.º WO 2015/189356 y W Publicación Internacional N.º WO 2015/189357. Por lo tanto, las combinaciones posibles incluyen IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21 e IL-2, IL-15 e IL-21, siendo esta última la que se utiliza especialmente en muchas realizaciones. El uso de combinaciones de citoquinas favorece específicamente la generación de linfocitos y, en particular, de células T, tal como se describe en el presente documento.

TABLA 4: Secuencias de aminoácidos de las interleucinas.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 3: IL-2 humana recombinante (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 138
SEQ ID N.º 4: Aldesleucina	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID N.º 5: IL-4 humana recombinante (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TESFLCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID N.º 6: IL-7 humana recombinante (rhIL-7)	MDCDIEGNDG KQVDSVIMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 133
SEQ ID N.º 7: IL-15 humana recombinante (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
SEQ ID N.º 8: IL-21 humana recombinante (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

D. ETAPA D: Segunda Expansión

[0291] En algunas realizaciones, la población de células TIL se expande en número después de la recolección y el procesamiento a granel inicial, por ejemplo, después de la Etapa A y la Etapa B, y la transición denominada Etapa C, como se indica en la Figura 1). Esta expansión adicional se denomina en el presente documento segunda expansión, que puede incluir procesos de expansión generalmente denominados en la técnica proceso de expansión rápida (REP; así como procesos como los indicados en la etapa D de la figura 1). La segunda expansión se realiza generalmente utilizando un medio de cultivo que comprende una serie de componentes, incluyendo células alimentadoras, una fuente de citoquinas y un anticuerpo anti-CD3, en un recipiente permeable al gas.

[0292] En algunas realizaciones, la segunda expansión o segunda expansión de TIL (que puede incluir expansiones a veces denominadas REP; así como procesos como se indica en la Etapa D de la Figura 1) de TIL puede realizarse utilizando cualquier matraz o recipiente de TIL conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante 7 días, 8 días, 9 días, 10 días u 11 días. La segunda expansión de TIL puede durar entre 7 y 14 días. La segunda expansión de TIL puede durar entre 8 y 14 días. La segunda expansión de TIL puede durar entre 9 y 14 días. La segunda expansión de TIL puede durar entre 10 y 14 días. La segunda expansión de TIL puede durar entre 11 y 14 días. La segunda expansión de TIL puede durar entre 12 y 14 días. La segunda expansión de TIL puede proceder durante unos 13 días a unos 14 días La segunda expansión TIL puede proceder durante unos 14 días.

[0293] En una realización, la segunda expansión puede ser realizada en un contenedor permeable a gas usando los métodos de la presente divulgación (incluyendo por ejemplo, expansiones referidas como REP; así como procesos como los indicados en la Etapa D de la Figura 1). Por ejemplo, los TIL pueden expandirse rápidamente utilizando la estimulación inespecífica del receptor de células T en presencia de interleucina-2 (IL-2) o interleucina-15 (IL-15). El estímulo no específico del receptor de células T puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3, como unos 30 ng/ml de OKT3, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 (disponible comercialmente en Ortho-McNeil, Raritan, NJ o Miltenyi Biotech, Auburn, CA) o UHCT-1 (disponible comercialmente en BioLegend, San Diego, CA, EE.UU.). Los TIL pueden expandirse para inducir una mayor estimulación de los TIL *in vitro* mediante la inclusión de uno o más antígenos durante la segunda

expansión, incluyendo porciones antigénicas de los mismos, tales como epítopo(s), del cáncer, que pueden expresarse opcionalmente a partir de un vector, tal como un péptido de unión al antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), *por ejemplo,* 0,3 µM MART-1:26-35 (27 L) o gpl 00:209-217 (210M), opcionalmente en presencia de un factor de crecimiento de células T, como 300 UI/mL IL-2 o IL-15. Otros antígenos adecuados pueden incluir, *por ejemplo,* NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno del cáncer de tirosinasa, MAGE-A3, SSX-2 y VEGFR2, o porciones antigénicas de los mismos. Los TIL también pueden expandirse rápidamente mediante la reestimulación con el mismo antígeno o antígenos del cáncer pulsados sobre células presentadoras de antígenos que expresan HLA-A2. Alternativamente, los TIL pueden ser reestimulados adicionalmente con, *por ejemplo*, linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2. En algunas realizaciones, la reestimulación se produce como parte de la segunda expansión. En algunas realizaciones, la segunda expansión se produce en presencia de linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2.

[0294] El medio de cultivo celular comprende además IL-2. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 1000 UI/mL, alrededor de 1500 UI/mL, alrededor de 2000 UI/mL, alrededor de 2500 UI/mL, alrededor de 3000 UI/mL, alrededor de 3500 UI/mL, alrededor de 4000 UI/mL, alrededor de 4500 UI/mL, alrededor de 5000 UI/mL, alrededor de 5500 UI/mL, alrededor de 6000 UI/mL, alrededor de 6500 UI/mL, alrededor de 7000 UI/mL, alrededor de 7500 UI/mL, o alrededor de 8000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 1000 y 2000 UI/mL, entre 2000 y 3000 UI/mL, entre 3000 y 4000 UI/mL, entre 4000 y 5000 UI/mL, entre 5000 y 6000 UI/mL, entre 6000 y 7000 UI/mL, entre 7000 y 8000 UI/mL, o entre 8000 UI/mL de IL-2.

[0295] El medio de cultivo celular comprende el anticuerpo OKT-3. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 30 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,1 ng/ml, aproximadamente 0,5 ng/ml, aproximadamente 1 ng/ml, aproximadamente 2,5 ng/ml, aproximadamente 5 ng/ml, aproximadamente 7,5 ng/ml, aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 15 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 25 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml, aproximadamente 35 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 70 ng/ml, aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 90 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, y aproximadamente 1 µg/ml del anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 0,1 ng/mL y 1 ng/mL, entre 1 ng/mL y 5 ng/mL, entre 5 ng/mL y 10 ng/mL, entre 10 ng/mL y 20 ng/mL, entre 20 ng/mL y 30 ng/mL, entre 30 ng/mL y 40 ng/mL, entre 40 ng/mL y 50 ng/mL, y entre 50 ng/mL y 100 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En algunas realizaciones, el anticuerpo OKT-3 es muromonab.

[0296] En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende uno o más agonistas del TNFRSF en un medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF comprende un agonista del 4-1BB. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF es un agonista 4-1BB, y el agonista 4-1BB se selecciona del grupo que consiste en urelumab, utomilumab, EU-101, una proteína de fusión, y fragmentos, derivados, variantes, biosimilares y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF se añade a una concentración suficiente para alcanzar una concentración en el medio de cultivo celular de entre 0,1 µg/mL y 100 µg/mL. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF se añade a una concentración suficiente para alcanzar una concentración en el medio de cultivo celular de entre 20 µg/mL y 40 µg/mL.

[0297] En algunas realizaciones, además de uno o más agonistas del TNFRSF, el medio de cultivo celular comprende además IL-2 a una concentración inicial de aproximadamente 3000 UI/mL y anticuerpo OKT-3 a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/mL, y en donde el uno o más agonistas del TNFRSF comprende un agonista 4-1BB.

[0298] En algunas realizaciones, se emplea una combinación de IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21 durante la segunda expansión. En algunas realizaciones, IL-2, IL-7, IL-15, y/o IL-21 así como cualquier combinación de las mismas puede incluirse durante la segunda expansión, incluyendo por ejemplo durante un proceso de la Etapa D según la Figura 1, así como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea una combinación de IL-2, IL-15, e IL-21 durante la segunda expansión. En algunas realizaciones, la IL-2, la IL-15 y la IL-21, así como cualquier combinación de las mismas, pueden incluirse durante los procesos de la Etapa D según la Figura 1 y como se describe en el presente documento.

[0299] En algunas realizaciones, la segunda expansión puede llevarse a cabo en un medio de cultivo celular suplementado que comprenda IL-2, OKT-3, células alimentadoras presentadoras de antígeno y, opcionalmente, un agonista del TNFRSF. En algunas realizaciones, la segunda expansión se produce en un medio de cultivo celular suplementado. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular suplementado comprende IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APCs; también denominadas células alimentadoras presentadoras de antígeno). En algunas realizaciones, la segunda expansión se produce en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno (*es decir,* células presentadoras de antígeno).

[0300] En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 500 UI/mL de IL-15, alrededor de 400 UI/mL de IL-15, alrededor de 300 UI/mL de IL-15, alrededor de 200 UI/mL de IL-15, alrededor de 180 UI/mL de IL-15, alrededor de 160 UI/mL de IL-15, alrededor de 140 UI/mL de IL-15, alrededor de 120 UI/mL de IL-15, o alrededor de 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de

aproximadamente 500 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 400 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 300 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 200 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-15. En una realización preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15.

[0301] En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 20 UI/mL de IL-21, alrededor de 15 UI/mL de IL-21, alrededor de 12 UI/mL de IL-21, alrededor de 10 UI/mL de IL-21, alrededor de 5 UI/mL de IL-21, alrededor de 4 UI/mL de IL-21, alrededor de 3 UI/mL de IL-21, alrededor de 2 UI/mL de IL-21, alrededor de 1 UI/mL de IL-21, o alrededor de 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 20 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 15 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 12 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 10 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 5 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 2 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-21. En una realización preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21.

[0302] En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno (APCs) son PBMCs. En una realización, la proporción de TILs a PBMCs y/o células presentadoras de antígeno en la expansión rápida y/o la segunda expansión es de aproximadamente 1 a 25, aproximadamente 1 a 50, aproximadamente 1 a 100, aproximadamente 1 a 125, aproximadamente 1 a 150, aproximadamente 1 a 175, aproximadamente 1 a 200, aproximadamente 1 a 225, aproximadamente 1 a 250, aproximadamente 1 a 275, aproximadamente 1 a 300, aproximadamente 1 a 325, aproximadamente 1 a 350, aproximadamente 1 a 375, aproximadamente 1 a 400, o aproximadamente 1 a 500. En una realización, la proporción de TILs a PBMCs en la expansión rápida y/o la segunda expansión está entre 1 a 50 y 1 a 300. En una realización, la proporción de TILs a PBMCs en la expansión rápida y/o la segunda expansión es entre 1 a 100 y 1 a 200.

[0303] En una realización, lo REP y/o la segunda expansión se lleva a cabo en matraces con los TIL a granel mezclados con un exceso de 100 o 200 veces de células alimentadoras inactivadas, 30 mg/mL de anticuerpo OKT3 anti-CD3 y 3000 UI/mL de IL-2 en 150 ml de medio. Se realiza la sustitución de los medios (generalmente 2/3 de sustitución de los medios mediante respiración con medios frescos) hasta que las células se transfieren a una cámara de crecimiento alternativa. Entre las cámaras de crecimiento alternativas se incluyen los matraces G-REX y los contenedores permeables a los gases, como se explica más detalladamente a continuación.

[0304] En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, la segunda expansión (que puede incluir procesos denominados proceso REP) se acorta a 7-14 días, como se discute en los ejemplos y figuras. En algunas realizaciones, la segunda expansión se acorta a 11 días.

[0305] En una realización, el REP y/o la segunda expansión pueden llevarse a cabo utilizando matraces T-175 y bolsas permeables al gas como se ha descrito previamente (Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42) o material de cultivo permeable a los gases (matraces G-Rex). En algunas realizaciones, la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas expansiones rápidas) se lleva a cabo en matraces T-175, y pueden añadirse a cada matraz T-175 aproximadamente 1×10^6 TIL suspendidos en 150 mL de medio. Los TIL pueden cultivarse en una mezcla 1 a 1 de CM y medio AIM-V, suplementada con 3000 UI por mL de IL-2 y 30 ng por ml de anti-CD3. Los matraces T-175 pueden incubarse a 37 °C en un 5% de CO_2. La mitad del medio puede cambiarse el día 5 utilizando un medio 50/50 con 3000 UI por mL de IL-2. En algunas realizaciones, en el día 7 las células de dos matraces T-175 pueden combinarse en una bolsa de 3 L y 300 mL de AIM V con 5% de suero AB humano y 3000 UI por mL de IL-2 se añadieron a los 300 ml de suspensión de TIL. El número de células de cada bolsa se contaba cada uno o dos días y se añadía medio fresco para mantener el recuento celular entre 0,5 y $2,0 \times 10^6$ células/mL.

[0306] En una realización, la segunda expansión (que puede incluir expansiones referidas como REP, así como las referidas en la Etapa D de la Figura 1) puede realizarse en matraces permeables al gas de 500 mL de capacidad con fondos de silicona permeables al gas de 100 cm (G-Rex 100, disponible comercialmente en Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, EE.UU.), pueden cultivarse 5×10^6 o 10×10^6 TIL con PBMC en 400 mL de medio 50/50, suplementado con 5% de suero AB humano, 3000 UI por mL de IL-2 y 30 ng por ml de anti-CD3 (OKT3). Los matraces G-Rex 100 pueden incubarse a 37°C en un 5% de CO_2. El día 5, pueden extraerse 250 mL de sobrenadante y colocarse en frascos de centrífuga y centrifugarse a 1500 rpm (491 × g) durante 10 minutos. Los pellets de TIL pueden volver a suspenderse con 150 mL de medio fresco con 5% de suero AB humano, 3000 UI por mL de IL-2, y añadirse de nuevo a los matraces G-Rex 100 originales. Cuando los TIL se expanden en serie en matraces G-Rex 100, el día 7 los TIL de cada

G-Rex 100 pueden suspenderse en los 300 mL de medio presentes en cada matraz y la suspensión celular puede dividirse en 3 alícuotas de 100 mL que pueden utilizarse para sembrar 3 matraces G-Rex 100. A continuación, se pueden añadir 150 mL de AIM-V con 5% de suero AB humano y 3000 UI por mL de IL-2 a cada matraz. Los matraces G-Rex 100 pueden incubarse a 37° C en 5% CO_2 y después de 4 días pueden añadirse 150 mL de AIM-V con 3000 UI por mL de IL-2 a cada matraz G-REX 100. Las células pueden recolecciónrse en el día 14 de cultivo.

[0307] En una realización, la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas REP) se realiza en matraces con los TIL a granel mezclados con un exceso de 100 o 200 veces de células alimentadoras inactivadas, 30 mg/mL de anticuerpo anti-CD3 OKT3 y 3000 UI/mL de IL-2 en 150 ml de medio. En algunas realizaciones, la sustitución de los medios se lleva a cabo hasta que las células se transfieren a una cámara de crecimiento alternativa. En algunas realizaciones, 2/3 del medio se sustituye por respiración con medio fresco. En algunas realizaciones, las cámaras de crecimiento alternativas incluyen matraces G-REX y recipientes permeables a los gases, como se explica con más detalle a continuación.

[0308] En una realización, la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas REP) se lleva a cabo y comprende además una etapa donde los TIL se seleccionan para una reactividad tumoral superior. Puede utilizarse cualquier método de selección conocido en la técnica. Por ejemplo, los métodos descritos en La publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2016/0010058 A1 puede utilizarse para la selección de TIL para una reactividad tumoral superior.

[0309] Opcionalmente, se puede realizar un ensayo de viabilidad celular después de la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas expansión REP), utilizando ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de exclusión con azul tripán en una muestra de TIL, que marca selectivamente las células muertas y permite evaluar la viabilidad. En algunas realizaciones, las muestras de TIL pueden contarse y determinarse su viabilidad utilizando un contador celular automatizado Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). En algunas realizaciones, la viabilidad se determina según el protocolo estándar del Contador Celular Automático del Citómetro de Imagen Cellometer K2.

[0310] En algunas realizaciones, la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas REP) de TIL puede llevarse a cabo utilizando matraces T-175 y bolsas permeables al gas como se ha descrito previamente (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751, y Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother, 26:332-342) o matraces G-Rex permeables al gas. En algunas realizaciones, la segunda expansión se lleva a cabo utilizando matraces. En algunas realizaciones, la segunda expansión se lleva a cabo utilizando matraces G-Rex permeables al gas. En algunas realizaciones, la segunda expansión se lleva a cabo en matraces T-175, y se suspenden aproximadamente 1×10^6 TIL en aproximadamente 150 mL de medio y se añade a cada matraz T-175. Los TIL se cultivan con PBMC alogénicas irradiadas (50 Gy) como células "alimentadoras" en una proporción de 1 a 100 y las células se cultivaron en una mezcla 1 a 1 de CM y medio AIM-V (medio 50/50), suplementado con 3000 UI/mL de IL-2 y 30 ng/mL de anti-CD3. Los matraces T-175 se incuban a 37°C en un 5% de CO_2. En algunas realizaciones, la mitad del medio se cambia en el día 5 utilizando un medio 50/50 con 3000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el día 7, las células de 2 matraces T-175 se combinan en una bolsa de 3 L y se añaden 300 mL de AIM-V con 5% de suero AB humano y 3000 UI/mL de IL-2 a los 300 mL de suspensión de TIL. El número de células en cada bolsa puede contarse cada uno o dos días y puede añadirse medio fresco para mantener el recuento de células entre 0,5 y 2,0 $\times 10^6$ células/mL aproximadamente.

[0311] En algunas realizaciones, la segunda expansión (incluyendo las expansiones denominadas REP) se llevan a cabo en matraces de 500 mL de capacidad con fondos de silicona permeables al gas de 100 cm^2 (G-Rex 100, Wilson Wolf) (Fig. 1), se cultivan aproximadamente 5×10^6 o 10×10^6 TIL con PBMC alogénicas irradiadas en una proporción de 1 a 100 en 400 mL de medio 50/50, suplementado con 3000 UI/mL de IL-2 y 30 ng/ mL de anti-CD3. Los matraces G-Rex 100 se incuban a 37 °C en un 5% de CO_2. En algunas realizaciones, el día 5, se extraen 250mL de sobrenadante y se colocan en frascos de centrífuga y se centrifugan a 1500 rpm (491g) durante 10 minutos. A continuación, los pellets de TIL pueden resuspenderse con 150 mL de medio 50/50 fresco con 3000 UI/ mL de IL-2 y añadirse de nuevo a los matraces G-Rex 100 originales. En las realizaciones en las que los TIL se expanden en serie en matraces G-Rex 100, en el día 7 los TIL de cada G-Rex 100 se suspenden en los 300 mL de medio presentes en cada matraz y la suspensión celular se divide en tres alícuotas de 100 mL que se utilizan para sembrar 3 matraces G-Rex 100. A continuación, se añaden 150 mL de AIM-V con 5% de suero AB humano y 3000 UI/mL de IL-2 a cada matraz. Los matraces G-Rex 100 se incuban a 37°C en 5% CO_2 y después de 4 días se añaden 150 mL de AIM-V con 3000 IU/mL de IL-2 a cada matraz G-Rex 100. Las células se recolecciónn el día 14 de cultivo.

[0312] Los diversos receptores de antígenos de los linfocitos T y B se producen por recombinación somática de un número limitado, pero grande, de segmentos génicos. Estos segmentos de genes: V (variable), D (diversidad), J (unión), y C (constante), determinan la especificidad de unión y las aplicaciones posteriores de las inmunoglobulinas y los receptores de células T (TCR). La presente invención proporciona un método para generar TILs que exhiben y aumentan la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos por el presente método muestran un aumento de la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos en la segunda expansión muestran un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, el aumento de la diversidad es un aumento de la diversidad de inmunoglobulinas y/o de la diversidad de receptores de células T. En algunas realizaciones, la diversidad está en la inmunoglobulina está en la cadena pesada de la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la

diversidad está en la inmunoglobulina está en la cadena ligera de la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la diversidad está en el receptor de células T. En algunas realizaciones, la diversidad está en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma, y delta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) alfa. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión de TCRab *(es decir,* TCRα/β).

[0313] El segundo medio de cultivo de expansión (*por ejemplo*, a veces referido como CM2 o el segundo medio de cultivo celular), comprende IL-2, OKT-3, así como las células alimentadoras presentadoras de antígeno (APCs), como se discute en más detalle a continuación.

[0314] En algunas realizaciones, la segunda expansión, por ejemplo, la Etapa D según la Figura 1, se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea un único biorreactor. En algunas realizaciones, el biorreactor único empleado es, por ejemplo, un G-REX -10 o un G-REX -100. En algunas realizaciones, el biorreactor de sistema cerrado es un único biorreactor.

1. Células alimentadoras y células presentadoras de antígeno

[0315] En una realización, los procedimientos de segunda expansión descritos en el presente documento (por ejemplo, incluyendo expansiones como las descritas en la Etapa D de la Figura 1, así como las denominadas REP) requieren un exceso de células alimentadoras durante la expansión REP TIL y/o durante la segunda expansión. En muchas realizaciones, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de unidades de sangre total estándar de donantes de sangre sanos. Las PBMC se obtienen utilizando métodos estándar como la separación en gradiente Ficoll-Paque.

[0316] En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se utilizan en los procedimientos REP, como se describe en los ejemplos, que proporciona un protocolo ejemplar para evaluar la incompetencia de replicación de PBMC alogénicas irradiadas.

[0317] En algunas realizaciones, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para su uso en los procedimientos de expansión de TIL aquí descritos si el número total de células viables en el día 14 es menor que el número inicial de células viables puestas en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (*es decir,* el día de inicio de la segunda expansión).

[0318] En algunas realizaciones, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para su uso en los procedimientos de expansión de TIL aquí descritos si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 y el día 14 no ha aumentado desde el número inicial de células viables puestas en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (*es decir,* el día de inicio de la segunda expansión). En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2.

[0319] En algunas realizaciones, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para su uso en los procedimientos de expansión de TIL aquí descritos si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 y el día 14 no ha aumentado desde el número inicial de células viables puestas en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (*es decir,* el día de inicio de la segunda expansión). En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 5-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 1000-6000 UI/ml de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 10-50 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 2000-5000 UI/ml de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 20-40 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 2000-4000 UI/ml de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 25-35 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 2500-3500 UI/ml de IL-2.

[0320] En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno son PBMCs. En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno son células alimentadoras presentadoras de antígeno artificiales. En una realización, la proporción de TIL respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de aproximadamente 1 a 25, aproximadamente 1 a 50, aproximadamente 1 a 100, aproximadamente 1 a 125, aproximadamente 1 a 150, aproximadamente 1 a 175, aproximadamente 1 a 200, aproximadamente 1 a 225, aproximadamente 1 a 250, aproximadamente 1 a 275, aproximadamente 1 a 300, aproximadamente 1 a 325, aproximadamente 1 a 350, aproximadamente 1 a 375, aproximadamente 1 a 400, o aproximadamente 1 a 500. En una realización, la proporción de TIL respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de entre 1 a 50 y 1 a 300. En una realización, la proporción de TIL respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de entre 1 a 100 y 1 a 200.

[0321] En una realización, los segundos procedimientos de expansión aquí descritos requieren una proporción de aproximadamente $2{,}5\times10^9$ células alimentadoras por aproximadamente 100×10^6 TIL. En otra realización, los procedimientos de segunda expansión descritos en el presente documento requieren una proporción de aproximadamente

$2,5\times10^9$ células alimentadoras por aproximadamente 50×10^6 TIL. En otra realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en el presente documento requieren aproximadamente $2,5\times10^9$ células alimentadoras para aproximadamente 25×10^6 TIL.

[0322] En una realización, los procedimientos de segunda expansión aquí descritos requieren un exceso de células alimentadoras durante la segunda expansión. En muchas realizaciones, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de unidades de sangre total estándar de donantes de sangre sanos. Las PBMC se obtienen utilizando métodos estándar como la separación en gradiente Ficoll-Paque. En una realización, se utilizan células artificiales presentadoras de antígeno (aAPC) en lugar de PBMC.

[0323] En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se utilizan en los procedimientos de expansión de TIL descritos en el presente documento, incluidos los procedimientos ejemplares descritos en las figuras y ejemplos.

[0324] En una realización, las células presentadoras de antígeno artificiales son usadas en la segunda expansión como un reemplazo para, o en combinación con, PBMCs.

2. Citocinas

[0325] Los métodos de expansión aquí descritos generalmente utilizan medios de cultivo con altas dosis de una citoquina, en particular IL-2, como es conocido en la técnica.

[0326] Alternativamente, el uso de combinaciones de citoquinas para la expansión rápida y/o segunda expansión de TILS es adicionalmente posible, con combinaciones de dos o más de IL-2, IL-15 e IL-21 como se describe generalmente en la Publicación Internacional N.º WO 2015/189356 y W Publicación Internacional N.º WO 2015/189357. Por lo tanto, las combinaciones posibles incluyen IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21 e IL-2, IL-15 e IL-21, siendo esta última la que se utiliza especialmente en muchas realizaciones. El uso de combinaciones de citoquinas favorece específicamente la generación de linfocitos y, en particular, de células T, tal como se describe en el presente documento.

E. ETAPA E: Recolección TILS

[0327] Después de la segunda etapa de expansión, las células pueden ser recolecciónd as. En algunas realizaciones, los TIL se recolecciónn después de uno, dos, tres, cuatro o más etapas de expansión, por ejemplo, como se muestra en la Figura 1. En algunas realizaciones, los TIL se recolecciónn después de dos etapas de expansión, por ejemplo, como se muestra en la Figura 1.

[0328] Los TIL pueden ser recolecciónd os de cualquier manera apropiada y estéril, incluyendo por ejemplo por centrifugación. Los métodos para la recolección de TIL son bien conocidos en la técnica y cualquiera de ellos puede emplearse en el presente proceso. En algunas realizaciones, los TILS se recolecciónn utilizando un sistema automatizado.

[0329] Las recolecciónd oras de células y/o los sistemas de procesamiento celular están disponibles comercialmente de una variedad de fuentes, incluyendo, por ejemplo, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer, e Inotech Biosystems International, Inc. Cualquier recolecciónd ora basada en células puede emplearse con los presentes métodos. En algunas realizaciones, el recolecciónd or celular y/o los sistemas de procesamiento celular son recolecciónd ores celulares basados en membranas. En algunas realizaciones, la recolección de células se realiza mediante un sistema de procesamiento celular, como el sistema LOVO (fabricado por Fresenius Kabi). El término "sistema de procesamiento celular LOVO" también se refiere a cualquier instrumento o dispositivo fabricado por cualquier proveedor que pueda bombear una solución que comprenda células a través de una membrana o filtro, como una membrana giratoria o un filtro giratorio, en un entorno de sistema estéril y/o cerrado, que permita el flujo continuo y el procesamiento celular para eliminar el sobrenadante o el medio de cultivo celular sin peletización. En algunas realizaciones, el recolecciónd or celular y/o el sistema de procesamiento celular pueden llevar a cabo la separación celular, el lavado, el intercambio de fluidos, la concentración y/u otras etapas de procesamiento celular en un sistema cerrado y estéril.

[0330] En algunas realizaciones, la recolección, por ejemplo, la Etapa E según la Figura 1, se realiza desde un biorreactor de sistema cerrado. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea un único biorreactor. En algunas realizaciones, el biorreactor único empleado es, por ejemplo, un G-REX -10 o un G-REX -100. En algunas realizaciones, el biorreactor de sistema cerrado es un único biorreactor.

[0331] En algunas realizaciones, la Etapa E según la Figura 1, se realiza según los procesos descritos en el Ejemplo G. En algunas realizaciones, se accede al sistema cerrado mediante jeringas en condiciones estériles para mantener la esterilidad y la naturaleza cerrada del sistema. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado como el descrito en el Ejemplo G.

[0332] En algunas realizaciones, los TIL se recolecciónn de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo G. En algunas realizaciones, los TIL entre los días 1 y 11 se recolecciónn usando los métodos descritos en la Sección 8.5

(denominada recolección de TIL de Día 11 en el Ejemplo G). En algunas realizaciones, los TIL entre los días 12 y 22 se recolecciónn utilizando los métodos descritos en la Sección 8.12 (denominada recolección de TIL de día 22 en el Ejemplo G).

F. ETAPA F: Formulación final/ Transferencia a la bolsa de infusión

[0333] Una vez completados las Etapas A a E según se indica en un orden ejemplar en la Figura 1 y según se detalla anteriormente y en el presente documento, las células se transfieren a un recipiente para su uso en la administración a un paciente. En algunas realizaciones, una vez obtenido un número terapéuticamente suficiente de TIL mediante los métodos de expansión descritos anteriormente, se transfieren a un recipiente para su uso en la administración a un paciente.

[0334] En una realización, los TIL expandidos utilizando APC de la presente divulgación se administran a un paciente como una composición farmacéutica. En una realización, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un tampón estéril. Los TIL expandidos utilizando PBMC de la presente divulgación pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, las células T se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferiblemente dura aproximadamente de 30 a 60 minutos. Otras vías de administración adecuadas son la intraperitoneal, la intratecal, y la intralinfática.

G. Componentes opcionales del medio celular

1. Anticuerpos anti-CD3

[0335] Los medios de cultivo utilizados en los métodos de expansión descritos en el presente documento (incluidos los denominados REP, véase, por ejemplo, la Figura 1) también incluyen un anticuerpo anti-CD3. Un anticuerpo anti-CD3 en combinación con IL-2 induce la activación de las células T y la división celular en la población TIL. Este efecto puede observarse con anticuerpos de longitud completa, así como con fragmentos Fab y F(ab')2, prefiriéndose generalmente los primeros; véase, *por ejemplo,* Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719.

[0336] Como será apreciado por aquellos en la técnica, hay un número de anticuerpos anti CD3 humanos adecuados que encuentran uso en la invención, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales anti CD3 humanos de varios mamíferos, incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos murinos, humanos, primates, ratas, y caninos. En particular, se utiliza el anticuerpo OKT3 anti-CD3 (disponible comercialmente en Ortho-McNeil, Raritan, NJ o Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

TABLA 5: Secuencias de aminoácidos de muromonab (anticuerpo OKT-3 ejemplar)

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 1: Cadena pesada de Muromonab	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG YFPESVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRG PKPKSPVNAG VPAAVLGGPS VFIFPPKPKD ALMISLTPKV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID N.º 2: Cadena ligera Muromonab	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

2. AGONISTAS 4-1BB (CD137)

[0337] En una realización, el agonista TNFRSF es un agonista 4-1BB (CD137). El agonista 4-1BB puede ser cualquier molécula de unión 4-1BB conocida en la técnica. La molécula de unión a 4-1BB puede ser un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión capaz de unirse a 4-1BB humano o de mamífero. Los agonistas 4-1BB o las moléculas de unión

4-1BB pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isotipo (*por ejemplo,* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase*(por ejemplo,* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. El agonista 4-1BB o la molécula de unión 4-1BB puede tener tanto una cadena pesada como una ligera. Tal como se utiliza en el presente documento, el término molécula de unión también incluye anticuerpos (incluidos anticuerpos de longitud completa), anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (*p. ej.*, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, y fragmentos de anticuerpos, *por ejemplo*, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores, y formas modificadas de anticuerpos, *por ejemplo*, moléculas scFv, que se unen a 4-1BB. En una realización, el agonista 4-1BB es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo totalmente humano. En una realización, el agonista 4-1BB es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, los agonistas 4-1BB para su uso en los métodos y composiciones actualmente divulgados incluyen anticuerpos anti-4-1BB, anticuerpos humanos anti-4-1BB, anticuerpos de ratón anti-4-1BB, anticuerpos de mamífero anti-4-1BB, anticuerpos monoclonales anti-4-1BB, anticuerpos policlonales anti-4-1BB, anticuerpos quiméricos anti-4-1BB, adnectinas anti-4-1BB, anticuerpos de dominio anti-4-1BB, fragmentos anti-4-1BB de cadena simple, fragmentos anti-4-1BB de cadena pesada, fragmentos anti-4-1BB de cadena ligera, proteínas de fusión anti-4-1BB, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, o biosimilares de los mismos. Se sabe que los anticuerpos agonistas anti-4-1BB inducen fuertes respuestas inmunitarias. Lee, et al., PLOS One 2013, 8, e69677. En una realización preferida, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal agonista, anti-4-1BB humanizado o totalmente humano (*es decir,* un anticuerpo derivado de una única línea celular). En una realización, el agonista 4-1BB es EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), utomilumab, o urelumab, o un fragmento, derivado, conjugado, variante, o biosimilar del mismo. En una realización preferida, el agonista 4-1BB es utomilumab o urelumab, o un fragmento, derivado, conjugado, variante o biosimilar del mismo.

[0338] En una realización preferida, el agonista 4-1BB o la molécula de unión 4-1BB también puede ser una proteína de fusión. En una realización preferida, un agonista 4-1BB multimérico, como un agonista 4-1BB trimérico o hexamérico (con tres o seis dominios de unión al ligando), puede inducir una agrupación superior del receptor (4-1BBL) y la formación de complejos de señalización celular interna en comparación con un anticuerpo monoclonal agonista, que típicamente posee dos dominios de unión al ligando. Las proteínas de fusión triméricas (trivalentes) o hexaméricas (o hexavalentes) o mayores que comprenden tres dominios de unión a TNFRSF e IgG1-Fc y que opcionalmente unen además dos o más de estas proteínas de fusión se describen, *por ejemplo,* en Gieffers, et al., Mol.

[0339] Se sabe que los anticuerpos 4-1BB agonísticos y las proteínas de fusión inducen fuertes respuestas inmunitarias. En una realización preferida, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión que se une específicamente al antígeno 4-1BB de manera suficiente para reducir la toxicidad. En algunas realizaciones, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal 4-1BB agonista o una proteína de fusión que anula la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo la citotoxicidad de células NK. En algunas realizaciones, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal 4-1BB agonista o una proteína de fusión que anula la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). En algunas realizaciones, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal 4-1BB agonista o una proteína de fusión que anula la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En algunas realizaciones, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal 4-1BB agonista o una proteína de fusión que anula la funcionalidad de la región Fc.

[0340] En algunas realizaciones, los agonistas 4-1BB se caracterizan por unirse al 4-1BB humano (SEQ ID N.º:9) con alta afinidad y actividad agonística. En una realización, el agonista 4-1BB es una molécula de unión que se une al 4-1BB humano (SEQ ID N.º:9). En una realización, el agonista 4-1BB es una molécula de unión que se une al 4-1BB murino (SEQ ID N.º:10). Las secuencias de aminoácidos del antígeno 4-1BB a las que se une un agonista 4-1BB o una molécula de unión se resumen en la Tabla 6.

TABLA 6. Secuencias de aminoácidos de los antígenos 4-1BB.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)
SEQ ID N.º:9 humano 4-1BB. Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 9 (Homo sapiens)	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 N.º:10 murino 4-1BB. Superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 9 (Mus musculus)	MGNRCYNVVV IVLLVVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY DPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CERDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGNSG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGYEL 255

[0341] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista 4-1BB que se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 100 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 90 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 80 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 70 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 60 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 50 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 40 pM o inferior, o se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 30 pM o inferior.

[0342] En algunas realizaciones, las composiciones, los procesos y los métodos descritos incluyen un agonista 4-1BB que se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ l/M-s o más rápido, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ l/M-s o más rápido, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 8×10^5 l/M-s o más rápido, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 85×10^5 l/M-s o más rápido, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 9×10^5 l/M-s o más rápido, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente $9,5 \times 10^5$ l/M-s o más rápido, o se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 1×10^6 l/M-s o más rápido.

[0343] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista 4-1BB que se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2×10^{-5} 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente $2,1 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente $2,2 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente $2,3 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente $2..4 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente $2,5 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente $2,6 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento o se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente $2,8 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente $2,9 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, o se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 3×10^{-5} 1/s o más lento.

[0344] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista 4-1BB que se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o inferior, o se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o inferior.

[0345] En una realización preferida, el agonista 4-1BB es utomilumab, también conocido como PF-05082566 o MOR-7480, o un fragmento, derivado, variante, o biosimilar del mismo. Utomilumab está disponible en Pfizer, Inc. Utomilumab es un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G2-lambda, anti-[*Homo sapiens* TNFRSF9 (miembro 9 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), 4-1BB, antígeno de células T ILA, CD137)], *Homo sapiens* (totalmente humano). Las secuencias de aminoácidos de utomilumab se exponen en la Tabla EE. Utomilumab comprende sitios de glicosilación en Asn59 y Asn292; puentes disulfuro intracadena pesada en las posiciones 22-96 (V_H-V_L), 143-199 (C_H1-C_L), 256-316 (C_H2) y 362-420 (C_H3); puentes disulfuro intracadena ligera en las posiciones 22'-87' (V_H-V_L) y 136'-195' (C_H1-C_L); puentes disulfuro cadena pesada-cadena pesada intercadena en las posiciones 218-218, 219-219, 222-222 y 225-225 de la isoforma IgG2A, en las posiciones 218-130, 219-219, 222-222 y 225-225 de la isoforma IgG2/B y en las posiciones 219-130 (2), 222-222 y 225-225 de la isoforma IgG2B; y puentes disulfuro entre cadenas pesadas y cadenas ligeras en las posiciones 130-213' (2) de la isoforma IgG2A, en las posiciones 218-213' y 130-213' de la isoforma IgG2A/B, y en las posiciones 218-213' (2) de la isoforma IgG2B. La preparación y propiedades de utomilumab y sus variantes y fragmentos se describen en Patentes de EE.UU. N.º 8.821.867; 8.337.850; y 9.468.678, y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2012/032433 A1. Las características preclínicas de utomilumab se describen en Fisher, et al., Cancer Immunolog. & Immunother. 2012, 61, 1721-33. Entre los ensayos clínicos actuales de utomilumab en diversas indicaciones hematológicas y de tumores sólidos se incluyen Identificadores de clinicaltrials.gov de los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU. NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066, y NCT02554812.

[0346] En una realización, un agonista 4-1BB comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:11 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:12. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:11 y SEQ ID N.º:12, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:11 y SEQ ID N.º:12, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:11 y SEQ ID N.º:12, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:11 y SEQ ID N.º:12, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:11 y SEQ ID N.º:12, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB

comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:11 y SEQ ID N.º:12, respectivamente.

[0347] En una realización, el agonista 4-1BB comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o regiones variables (VRs) de utomilumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista 4-1BB comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:13, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista 4-1BB comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º: 14, y sus sustituciones conservadoras de aminoácidos. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:13 y SEQ ID N.º: 14, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:13 y SEQ ID N.º:14, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:13 y SEQ ID N.º:14, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:13 y SEQ ID N.º:14, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:13 y SEQ ID N.º:14, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende un anticuerpo scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:13 y SEQ ID N.º:14.

[0348] En una realización, un agonista 4-1BB comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:15, SEQ ID N.º:16, y SEQ ID N.º:17, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:18, SEQ ID N.º:19, y SEQ ID N.º:20, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0349] En una realización, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista 4-1BB aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia al utomilumab. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo 4-1BB que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo,* 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento o producto biológico de referencia, donde el medicamento o producto biológico de referencia es utomilumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista 4-1BB autorizado o presentado para autorización, en el que el anticuerpo agonista 4-1BB se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es utomilumab. El anticuerpo agonista 4-1BB puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es utomilumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es utomilumab.

TABLA 7. Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos agonistas 4-1BB relacionados con utomilumab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:11 cadena pesada para utomilumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:12 cadena ligera para utomilumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:13 región variable de la cadena pesada de utomilumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:14 región variable de cadena ligera para utomilumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:15 cadena pesada CDR1 para utomilumab	STYWIS	6
SEQ ID N.º:16 cadena pesada CDR2 para	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17

(continuación)

utomilumab		
SEQ ID N.º:17 cadena pesada CDR3 para utomilumab	RGYGIFDY	8
SEQ ID N.º:18 cadena ligera CDR1 para utomilumab	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID N.º:19 cadena ligera CDR2 para utomilumab	QDKNRPS	7
SEQ ID N.º:20 cadena ligera CDR3 para utomilumab	ATYTGFGSLA V	11

[0350] En una realización preferida, el agonista 4-1BB es el anticuerpo monoclonal urelumab, también conocido como BMS-663513 y 20H4.9.h4a, o un fragmento, derivado, variante o biosimilar del mismo. Urelumab está disponible en Bristol-Myers Squibb, Inc. y Creative Biolabs, Inc. Urelumab es un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G4-kappa, anti-[*Homo sapiens* TNFRSF9 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, 4-1BB, T cell antigen ILA, CD137)], *Homo sapiens* (totalmente humano). Las secuencias de aminoácidos de urelumab se exponen en la Tabla EE. Urelumab comprende sitios de N-glicosilación en las posiciones 298 (y 298''); puentes disulfuro intracadena de cadena pesada en las posiciones 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 262-322 (C_H2) y 368-426 (C_H3) (y en las posiciones 22''-95'', 148''-204'', 262''-322'' y 368''-426''); puentes disulfuro intracadena ligera en las posiciones 23'-88' (V_H-V_L) y 136'-196' (C_H1-C_L) (y en las posiciones 23'''-88''' y 136'''-196'''); puentes disulfuro cadena pesada-cadena pesada intercadena en las posiciones 227-227'' y 230-230''; y puentes disulfuro cadena pesada-cadena ligera intercadena en 135-216' y 135''-216'''. La preparación y las propiedades de urelumab y sus variantes y fragmentos se describen en Patentes de EE.UU. N.º 7,288,638 y 8,962,804. Las características preclínicas y clínicas de urelumab se describen en Segal, et al., Clin. Cancer Res. 2016, disponible en http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-16-1272. Entre los ensayos clínicos actuales de urelumab en diversas indicaciones hematológicas y de tumores sólidos se incluyen Identificadores de clinicaltrials.gov de los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU. NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 y NCT01471210.

[0351] En una realización, un agonista 4-1BB comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:21 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:22. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente.

[0352] En una realización, el agonista 4-1BB comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de urelumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada del agonista 4-1BB (V_H) comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:23, y la región variable de la cadena ligera del agonista 4-1BB (V_L) comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:24, y sustituciones aminoacídicas conservativas de la misma. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende un anticuerpo scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24.

[0353] En una realización, un agonista 4-1BB comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:25, SEQ ID N.º:26, y SEQ ID N.º:27, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:28, SEQ ID N.º:29, y SEQ ID N.º:30, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0354] En una realización, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista 4-1BB aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a urelumab. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo 4-1BB que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo,* 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento o producto biológico de referencia, donde el medicamento o producto biológico de

referencia es urelumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista 4-1BB autorizado o presentado para autorización, en el que el anticuerpo agonista 4-1BB se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es urelumab. El anticuerpo agonista 4-1BB puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es urelumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es urelumab.

TABLA 8: Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos agonistas 4-1BB relacionados con urelumab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:21 cadena pesada para urelumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:22 cadena ligera para urelumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:23 cadena pesada variable para urelumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:24 cadena ligera variable para urelumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID NO.º25 cadena pesada CDR1 para urelumab	GYYWS	5
SEQ ID N.º:26 cadena pesada CDR2 para urelumab	EINHGGYVTY NPSLES	16
SEQ ID N.º:27 cadena pesada CDR3 para urelumab	DYGPGNYDWY FDL	13
SEQ ID N.º:28 cadena ligera CDR1 para urelumab	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID N.º:29 cadena ligera CDR2 para urelumab	DASNRAT	7
SEQ ID N.º:30 cadena ligera CDR3 para urelumab	QQRSDWPPAL T	11

[0355] En una realización, el agonista 4-1BB se selecciona del grupo que consiste en 1D8, 3Elor, 4B4 (BioLegend 309809), H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532), BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX), 145501 (Leinco Technologies B591), el anticuerpo producido por la línea celular depositada como ATCC No. HB-11248 y divulgada en Patente de EE.UU. n.º 6.974.863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), anticuerpos divulgados en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2005/0095244, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 7.288.638 (como 20H4.9-IgGI (BMS-663031)), anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.887.673 (como 4E9 o BMS-554271), anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 7.214.493, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.303.121, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.569.997, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.905.685 (como 4E9 o BMS-554271), anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.362.325 (como 1D8 o BMS-469492; 3H3 o BMS-469497; o 3El), anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.974.863 (como 53A2); anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.210.669 (como 1D8, 3B8 o 3El), anticuerpos descritos en Patente de EE.UU. n.º 5.928.893, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.303.121, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. N.º 6,569,997, anticuerpos divulgados en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2012/177788, WO 2015/119923, y WO 2010/042433, y sus fragmentos, derivados, conjugados, variantes, o biosimilares.

[0356] En una realización, el agonista 4-1BB es una proteína de fusión agonista 4-1BB descrita en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1, y WO 2010/078966 A1; Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. US 2011/0027218 A1, US 2015/0126709 A1, US 2011/0111494 A1, US 2015/0110734 A1, y US 2015/0126710 A1; y Patentes de EE.UU. N.º 9,359,420, 9,340,599, 8,921,519, y 8,450,460.

[0357] En una realización, el agonista 4-1BB es una proteína de fusión agonística 4-1BB como se representa en la

Estructura I-A (proteína de fusión de fragmento Fc-anticuerpo C-terminal) o Estructura I-B (proteína de fusión de fragmento Fc-anticuerpo N-terminal), o un fragmento, derivado, conjugado, variante o biosimilar de la misma (véase, Figura 50). En las estructuras I-A y I-B, los cilindros se refieren a dominios individuales de unión a polipéptidos. Las estructuras I-A e I-B comprenden tres dominios de unión a TNFRSF enlazados linealmente derivados *, por ejemplo*, de 4-1BBL o un anticuerpo que se une a 4-1BB, que se pliegan para formar una proteína trivalente, que luego se une a una segunda proteína triavelente a través de IgG1-Fc (incluidos los dominios C_H3 y C_H2) se utiliza entonces para unir dos de las proteínas trivalentes a través de enlaces disulfuro (pequeños óvalos alargados), estabilizando la estructura y proporcionando un agonista capaz de reunir los dominios de señalización intracelular de los seis receptores y proteínas de señalización para formar un complejo de señalización. Los dominios de unión a TNFRSF denotados como cilindros pueden ser dominios scFv que comprenden, *por ejemplo*, una cadena V_H y una V_L conectadas por un enlazador que puede comprender residuos hidrofílicos y secuencias Gly y Ser para flexibilidad, así como Glu y Lys para solubilidad. Puede utilizarse cualquier diseño de dominio scFv, como los descritos en de Marco, Microbial Cell Factories, 2011, 10, 44; Ahmad, et al., Clin. & Dev. Immunol. 2012, 980250; Monnier, et al., Antibodies, 2013, 2, 193-208; o en referencias mencionadas en otras partes del presente documento. Las estructuras de proteínas de fusión de esta forma se describen en Patentes de EE.UU. N.º 9,359,420, 9,340,599, 8,921,519, y 8,450,460.

[0358] Las secuencias de aminoácidos para los otros dominios polipeptídicos de la estructura I-A se dan en la Tabla GG. El dominio Fc comprende preferentemente un dominio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID N.º:31) el dominio bisagra completo (aminoácidos 1-16 de SEQ ID N.º:31) o una porción del dominio bisagra (*por ejemplo*, aminoácidos 4-16 de SEQ ID N.º:31). Los enlazadores preferidos para conectar un anticuerpo Fc C-terminal pueden seleccionarse a partir de las formas de realización dadas en SEQ ID N.º:32 a SEQ ID N.º:41, incluyendo enlazadores adecuados para la fusión de polipéptidos adicionales.

TABLA 9: Secuencias de aminoácidos para proteínas de fusión TNFRSF, incluidas las proteínas de fusión 4-1BB, con diseño de proteína de fusión fragmento Fc-anticuerpo C-terminal (estructura I-A).

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 31 Dominio Fc	[illegible]	60
	[illegible]	120
	[illegible]	180
	[illegible]	230
SEQ ID N.º 32 enlazador	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID N.º 33 enlazador	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID N.º 34 enlazador	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID N.º 35 enlazador	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID N.º 36 enlazador	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID N.º 37 enlazador	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID N.º 38 enlazador	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
SEQ ID N.º 39 enlazador	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
SEQ ID N.º 40 enlazador	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
SEQ ID N.º 41 enlazador	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

[0359] Las secuencias de aminoácidos para los otros dominios polipeptídicos de la estructura I-B se dan en la Tabla HH. Si se fusiona un fragmento de anticuerpo Fc con el extremo N-terminal de una proteína de fusión TNRFSF como en la estructura I-B, la secuencia del módulo Fc es preferiblemente la que se muestra en SEQ ID N.º:42, y las secuencias enlazadoras se seleccionan preferiblemente de entre las realizaciones expuestas en SED ID N.º:43 a SEQ ID N.º:45.

TABLA 10: Secuencias de aminoácidos para proteínas de fusión TNFRSF, incluidas las proteínas de fusión 4-1BB, con diseño de proteína de fusión N-terminal de fragmento de anticuerpo Fc (estructura I-B).

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 42 Dominio Fc	[illegible]	60
	[illegible]	120
	[illegible]	180
	[illegible]	240
	[illegible]	246
SEQ ID N.º 43 enlazador	SGSGSGSGSG S	11
SEQ ID N.º 44 enlazador	SSSSSSGSGS GS	12
SEQ ID N.º 45 enlazador	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

[0360] En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a 4-1BB seleccionados del grupo que consiste en una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de utomilumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de urelumab, una cadena pesada

variable y una cadena ligera variable de utomilumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable seleccionadas entre las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables descritas en la Tabla GG, cualquier combinación de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de las anteriores, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, y biosimilares de las mismas.

[0361] En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que comprenden una secuencia 4-1BBL. En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que comprenden una secuencia según SEQ ID N.º:46. En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que comprenden una secuencia soluble 4-1BBL. En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que comprenden una secuencia según SEQ ID N.º:47.

[0362] En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:13 y SEQ ID N.º:14, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias V_H y V_L dadas en la Tabla 11, en la que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador.

TABLA 11: Dominios polipeptídicos adicionales útiles como dominios de unión 4-1BB en proteínas de fusión o como anticuerpos agonistas 4-1BB scFv.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA	60
	SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL	120
	TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA	180
	LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV	240
	TPEIPAGLPS PRSE	254
SEQ ID N.º:47 Dominio soluble 4-1BBL	LAQEEFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ	60
	LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL	120
	SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	168
SEQ ID N.º:48 cadena pesada variable para 4B4-1-1 versión 1	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY	60
	NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSP ITTAWFAYWG QGTLVTVS	118
SEQ ID N.º:49 cadena ligera variable para 4B4-1-1 versión 1	DIVMTQSPAT QSVTPGDSVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS	60
	RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	107
SEQ ID N.º:50 cadena pesada variable para 4B4-1-1 versión 2	QVQLQQPGAE LVEPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVRQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY	60
	NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSP ITTAWFAYWG QGTLVTVSA	119
SEQ ID N.º:51 cadena ligera variable para 4B4-1-1 versión 2	DIVMTQSPAT QSVTPGDSVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS	60
	RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGQ GTKLEIER	108
SEQ ID N.º:52 cadena pesada variable para H39E3-2	MEWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP	60
	GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	120
SEQ ID N.º:53 cadena ligera variable para H39E3-2	MRAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL DSDNQKNYL	60
	AWYQQKPGQP PKLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	110

[0363] En una realización, el agonista 4-1BB es un polipéptido de fusión de cadena única agonista 4-1BB que comprende (i) un primer dominio de unión 4-1BB soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de unión 4-1BB soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio de unión 4-1BB soluble, que comprende además un dominio adicional en el extremo N-terminal y/o C-terminal, y en el que el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc. En una realización, el agonista 4-1BB es un polipéptido de fusión de cadena única agonista 4-1BB que comprende (i) un primer dominio de unión 4-1BB soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de unión 4-1BB soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio de unión 4-1BB soluble, que comprende además un dominio adicional en el extremo N-terminal y/o C-terminal, en el que el dominio adicional es un dominio de

fragmento Fab o Fc, en el que cada uno de los dominios solubles 4-1BB carece de una región peduncular (que contribuye a la trimerización y proporciona una cierta distancia a la membrana celular, pero no forma parte del dominio de unión 4-1BB) y el primer y el segundo enlazador peptídico tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos.

[0364] En una realización, el agonista 4-1BB es un polipéptido de fusión de cadena simple agonista 4-1BB que comprende (i) un primer dominio de citocina de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de citocina de la superfamilia del TNF soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio soluble de citocina de la superfamilia TNF, donde cada uno de los dominios solubles de citocina de la superfamilia TNF carece de una región peduncular y el primer y el segundo enlazador peptídico tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos, y donde cada dominio de citocina de la superfamilia TNF es un dominio de unión a 4-1BB.

[0365] En una realización, el agonista 4-1BB es un anticuerpo scFv agonista 4-1BB que comprende cualquiera de los dominios V_H anteriores unido a cualquiera de los dominios V_L anteriores.

[0366] En una realización, el agonista 4-1BB es el anticuerpo agonista 4-1BB de BPS Bioscience catálogo n.º 79097-2, disponible comercialmente en BPS Bioscience, San Diego, CA, EE.UU.. En una realización, el agonista 4-1BB es el anticuerpo agonista 4-1BB de Creative Biolabs n.º de catálogo. MOM-18179, disponible comercialmente en Creative Biolabs, Shirley, NY, EE.UU.

3. OX40 (CD134) AGONISTAS

[0367] En una realización, el agonista TNFRSF es un agonista OX40 (CD134). El agonista de OX40 puede ser cualquier molécula de unión a OX40 conocida en la técnica. La molécula de unión a OX40 puede ser un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión capaz de unirse a OX40 humano o de mamífero. Los agonistas de OX40 o las moléculas de unión a OX40 pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isotipo (*por ejemplo,* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*por ejemplo,* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. El agonista de OX40 o la molécula de unión a OX40 puede tener una cadena pesada y una ligera. Tal como se utiliza en el presente documento, el término molécula de unión también incluye anticuerpos (incluidos anticuerpos de longitud completa), anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (*p. ej.*, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, y fragmentos de anticuerpos, *por ejemplo*, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores, y formas modificadas de anticuerpos, *por ejemplo*, moléculas scFv, que se unen a OX40. En una realización, el agonista OX40 es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo totalmente humano. En una realización, el agonista OX40 es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, los agonistas de OX40 para uso en los métodos y composiciones divulgados actualmente incluyen anticuerpos anti-OX40, anticuerpos humanos anti-OX40, anticuerpos de ratón anti-OX40, anticuerpos de mamífero anti-OX40, anticuerpos monoclonales anti-OX40, anticuerpos policlonales anti-OX40, anticuerpos quiméricos anti-OX40, adnectinas anti-OX40, anticuerpos de dominio anti-OX40, fragmentos anti-OX40 de cadena simple, fragmentos anti-OX40 de cadena pesada, fragmentos anti-OX40 de cadena ligera, proteínas de fusión anti-OX40, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, o biosimilares de los mismos. En una realización preferida, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal agonista, anti-OX40 humanizado o totalmente humano (*es decir*, un anticuerpo derivado de una única línea celular).

[0368] En una realización preferida, el agonista OX40 o la molécula de unión OX40 también puede ser una proteína de fusión. Las proteínas de fusión OX40 que comprenden un dominio Fc fusionado a OX40L se describen, por ejemplo, en Sadun, et al., J. Immunother. 2009, 182, 1481-89. En una realización preferida, un agonista multimérico de OX40, como un agonista trimérico o hexamérico de OX40 (con tres o seis dominios de unión a ligando), puede inducir una agrupación superior del receptor (OX40L) y la formación de complejos de señalización celular interna en comparación con un anticuerpo monoclonal agonista, que típicamente posee dos dominios de unión a ligando. Las proteínas de fusión triméricas (trivalentes) o hexaméricas (o hexavalentes) o mayores que comprenden tres dominios de unión a TNFRSF e IgG1-Fc y que opcionalmente unen además dos o más de estas proteínas de fusión se describen, *por ejemplo,* en Gieffers, et al., Mol.

[0369] Se sabe que los anticuerpos OX40 agonísticos y las proteínas de fusión inducen fuertes respuestas inmunitarias. Curti, et al., Cancer Res. 2013, 73, 7189-98. En una realización preferida, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión que se une específicamente al antígeno OX40 de manera suficiente para reducir la toxicidad. En algunas realizaciones, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal OX40 agonista o una proteína de fusión que anula la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo la citotoxicidad de células NK. En algunas realizaciones, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal OX40 agonista o una proteína de fusión que anula la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). En algunas realizaciones, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 o una proteína de fusión que anula la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En algunas realizaciones, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal OX40 agonista o una proteína de fusión que anula la funcionalidad de la región Fc.

[0370] En algunas realizaciones, los agonistas de OX40 se caracterizan por unirse a OX40 humano (SEQ ID N.º:54) con

alta afinidad y actividad agonística. En una realización, el agonista de OX40 es una molécula de unión que se une a OX40 humano (SEQ ID N.º:54). En una realización, el agonista de OX40 es una molécula de unión que se une a OX40 murino (SEQ ID N.º:55). Las secuencias de aminoácidos del antígeno OX40 a las que se une un agonista OX40 o una molécula de unión se resumen en la Tabla 12.

TABLA 12: Secuencias de aminoácidos de los antígenos OX40.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:54 OX40 humano (Homo sapiens)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ	60
	NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCDCR AGTQPLDSYK	120
	PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKRTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ	180
	GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL	240
	RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	277
SEQ ID N.º:55 OX40 murino (Mus musculus)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLDCRE TYFDGRRCDE SCQPGHRMVS RCDRTRDTVC	60
	HPCESGFFNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG	120
	VDCVPVSPGH FSPGDNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP	180
	TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPFTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW	240
	RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	272

[0371] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 100 pM o inferior, se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 90 pM o inferior, se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 80 pM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una K_D de aproximadamente 70 pM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una K_D de aproximadamente 60 pM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una K_D de aproximadamente 50 pM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una K_D de aproximadamente 40 pM o inferior, o se une a la OX40 humana o murina con una K_D de aproximadamente 30 pM o inferior.

[0372] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 7,5 × 10^5 1/M-s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 7,5 ×10^5 1/M-s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 8 × 10^5 1/M-s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 8,5 × 10^5 1/M-s o más rápido, se une a la OX40 humana o murina con un k_{assoc} de aproximadamente 9 × 10^5 1/M-s o más rápido, se une a la OX40 humana o murina con un k_{assoc} de aproximadamente 9,5 × 10^5 1/M-s o más rápido, o se une a la OX40 humana o murina con un k_{assoc} de aproximadamente 1 × 10^6 1/M-s o más rápido.

[0373] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,1 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,2 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,3 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,4 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a OX40 humano o murino El OX40 murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,5 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,6 × 10^{-5} 1/s o más lento o se une al OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,7 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,8 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al OX40 humano o murino con una kdissoc de aproximadamente 2,9 × 10^{-5} 1/s o más lento, o se une al OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 3 × 10^{-5} 1/s o más lento.

[0374] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o inferior, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o inferior, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o inferior, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o inferior, o se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o inferior.

[0375] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es tavolixizumab, también conocido como MEDI0562 o MEDI-0562. Tavolixizumab está disponible en la filial MedImmune de AstraZeneca, Inc. Tavolixizumab es una inmunoglobulina G1-kappa, *anti-[Homo sapiens* TNFRSF4 (receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) superfamilia miembro 4, OX40, CD134)], anticuerpo monoclonal humanizado y quimérico. Las secuencias de aminoácidos del tavolixizumab se exponen en la Tabla KK. El tavolixizumab comprende sitios de N-glicosilación en las posiciones 301 y 301", con glicanos complejos

bi-antenarios fucosilados de tipo CHO; puentes disulfuro intracadena de cadena pesada en las posiciones 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 265-325 (C_H2) y 371-429 (C_H3) (y en las posiciones 22''-95'', 148''-204'', 265''-325'', y 371''-429''); puentes disulfuro intracadena ligera en las posiciones 23'-88' (V_H-V_L) y 134'-194' (C_H1-C_L) (y en las posiciones 23'''-88''' y 134'''-194'''); puentes disulfuro cadena pesada-cadena pesada intercadena en las posiciones 230-230'' y 233-233''; y puentes disulfuro cadena pesada-cadena ligera intercadena en las posiciones 224-214' y 224''-214'''. Entre los ensayos clínicos actuales de tavolixizumab en diversas indicaciones de tumores sólidos se incluyen los de Identificadores NCT02318394 y NCT02705482 de clinicaltrials.gov de los Institutos Nacionales de Salud. de EE.UU..

[0376] En una realización, un agonista de OX40 comprende una cadena pesada dada por la SEQ ID N.º:56 y una cadena ligera dada por la SEQ ID N.º:57. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes o conjugados de los mismos. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente.

[0377] En una realización, el agonista OX40 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de tavolixizumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:58, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:59, y sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende un anticuerpo scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias que se muestran en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59.

[0378] En una realización, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:60, SEQ ID N.º:61, y SEQ ID N.º:62, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:63, SEQ ID N.º:64, y SEQ ID N.º:65, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0379] En una realización, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a tavolixizumab. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, por ejemplo, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es tavolixizumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista OX40 autorizado o presentado para autorización, donde el anticuerpo agonista OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es tavolixizumab. El anticuerpo agonista OX40 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es tavolixizumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es tavolixizumab.

TABLA 13: Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos agonistas OX40 relacionados con tavolixizumab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:56 cadena pesada para tavolixizumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:57 cadena ligera para tavolixizumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:58 región variable de la cadena pesada de tavolixizumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:59 región variable de cadena ligera para tavolixizumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:60 cadena pesada CDR1 para tavolixizumab	GSFSSGYWN	9
SEQ ID N.º:61 cadena pesada CDR2 para tavolixizumab	YIGYISYNGI TYH	13
SEQ ID N.º:62 cadena pesada CDR3 para tavolixizumab	RYKYDYDGGH AMDY	14
SEQ ID N.º:63 cadena ligera CDR1 para tavolixizumab	QDISNYLN	8
SEQ ID N.º:64 cadena ligera CDR2 para tavolixizumab	LLIYYTSKLH S	11
SEQ ID N.º:65 cadena ligera CDR3 para tavolixizumab	QQGSALPW	8

[0380] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es 11D4, que es un anticuerpo totalmente humano disponible en Pfizer, Inc. La preparación y las propiedades del 11D4 se describen en Patentes de EE.UU. N.º 7,960,515; 8,236,930; y 9,028,824. Las secuencias de aminoácidos de 11D4 se exponen en la Tabla LL.

[0381] En una realización, un agonista OX40 comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:66 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:67. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente.

[0382] En una realización, el agonista OX40 comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o regiones variables (VRs) de 11D4. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:68, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:69, y sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente.

[0383] En una realización, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:70, SEQ ID N.º:71, y SEQ ID N.º:72, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:73, SEQ ID N.º:74, y SEQ ID N.º:75, respectivamente, y sustituciones

conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0384] En una realización, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a 11D4. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo*, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 11D4. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista OX40 autorizado o presentado para autorización, donde el anticuerpo agonista OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 11D4. El anticuerpo agonista OX40 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 11D4. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 11D4.

TABLA 14: Secuencias de aminoácidos para anticuerpos agonistas OX40 relacionados con 11D4.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:66 cadena pesada para 11D4	[illegible]	
SEQ ID N.º:67 cadena ligera para 11D4	[illegible]	
SEQ ID N.º:68 región variable de la cadena pesada para 11D4	[illegible]	
SEQ ID N.º:69 región variable de la cadena ligera para 11D4	[illegible]	
SEQ ID N.º:70 cadena pesada CDR1 para 11D9	SYSMN	5
SEQ ID N.º:71 cadena pesada CDR2 para 11D4	YISSSSSTID YADSVKG	17
SEQ ID N.º:72 cadena pesada CDR3 para 11D4	ESGWYLFDY	9
SEQ ID N.º:73 cadena ligera CDR1 para 11D4	RASQGISSWL A	11
SEQ ID N.º:74 cadena ligera CDR2 para 11D4	AASSLQS	7
SEQ ID N.º:75 cadena ligera CDR3 para 11D4	QQYNSYPPT	9

[0385] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es 18D8, que es un anticuerpo totalmente humano disponible en Pfizer, Inc. La preparación y las propiedades del 18D8 se describen en Patentes de EE.UU. N.º 7,960,515; 8,236,930; y 9,028,824. Las secuencias de aminoácidos de 18D8 se exponen en la Tabla MM.

[0386] En una realización, un agonista OX40 comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:76 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:77. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente.

[0387] En una realización, el agonista OX40 comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o regiones variables (VRs) de 18D8. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:78, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:79, y sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente.

[0388] En una realización, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:80, SEQ ID N.º:81, y SEQ ID N.º:82, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:83, SEQ ID N.º:84, y SEQ ID N.º:85, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0389] En una realización, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a 18D8. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo*, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 18D8. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista OX40 autorizado o presentado para autorización, donde el anticuerpo agonista OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 18D8. El anticuerpo agonista OX40 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 18D8. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 18D8.

TABLA 15: Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos agonistas OX40 relacionados con 18D8.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:76 cadena pesada para 18D8	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:77 cadena ligera para 18D8	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:78 región variable de la cadena pesada para 18D8	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:79 región variable de la cadena ligera para 18D8	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º 80 cadena pesada CDR1 para 18D8	DYAMH	5
SEQ ID N.º:81 cadena pesada CDR2 para 18D8	GISWNSGSIG YADSVKG	17
SEQ ID N.º:82 cadena pesada CDR3 para 18D8	DQSTADYYFY YGMDV	15
SEQ ID N.º:83 cadena ligera CDR1 para 18D8	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID N.º:84 cadena ligera CDR2 para 18D8	DASNRAT	7
SEQ ID N.º 85 cadena ligera CDR3 para 18D8	QQRSNWPT	8

[0390] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es Hu119-122, que es un anticuerpo humanizado disponible de

GlaxoSmithKline plc. La preparación y las propiedades de Hu119-122 se describen en Patentes de EE.UU. N.º 9.006.399 y 9.163.085, y en la Publicación Internacional de Patentes n.º WO 2012/027328. Las secuencias de aminoácidos de Hu119-122 se exponen en la Tabla NN.

[0391] En una realización, el agonista OX40 comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o regiones variables (VRs) de Hu119-122. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:86, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:87, y sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente.

[0392] En una realización, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:88, SEQ ID N.º:89, y SEQ ID N.º:90, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:91, SEQ ID N.º:92, y SEQ ID N.º:93, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0393] En una realización, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a Hu119-122. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo,* 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu119-122. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista OX40 autorizado o presentado para autorización, donde el anticuerpo agonista OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu119-122. El anticuerpo agonista OX40 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu119-122. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu119-122.

TABLA 16: Secuencias de aminoácidos para anticuerpos agonistas OX40 relacionados con Hu119-122.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:86 región variable de la cadena pesada para Hu119-122	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:87 región variable de la cadena ligera para Hu119-122	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:88 cadena pesada CDR1 para Hu119-122	SHDMS	5
SEQ ID N.º:89 cadena pesada CDR2 para Hu119-122	AINSDGGSTY YPDTMER	17
SEQ ID N.º:90 cadena pesada CDR3 para Hu119-122	HYDDYYAWFA Y	11
SEQ ID N.º:91 cadena ligera CDR1 para Hu119-122	RASKSVSTSG YSYMH	15
SEQ ID N.º:92 cadena ligera CDR2 para Hu119-122	LASNLES	7
SEQ ID N.º:93 cadena ligera CDR3 para Hu119-122	QHSRELPLT	9

[0394] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es Hu106-222, que es un anticuerpo humanizado disponible de GlaxoSmithKline plc. La preparación y las propiedades de Hu106-222 se describen en Patentes de EE.UU. N.º 9.006.399 y 9.163.085, y en la Publicación Internacional de Patentes n.º WO 2012/027328. Las secuencias de aminoácidos de Hu106-222 se exponen en la Tabla OO.

[0395] En una realización, el agonista OX40 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de Hu106-222. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:94, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:95, y sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente.

[0396] En una realización, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:96, SEQ ID N.º:97, y SEQ ID N.º:98, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:99, SEQ ID N.º:100, y SEQ ID N.º:101, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0397] En una realización, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a Hu106-222. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo,* 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu106-222. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista OX40 autorizado o presentado para autorización, donde el anticuerpo agonista OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu106-222. El anticuerpo agonista OX40 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu106-222. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu106-222.

TABLA 17: Secuencias de aminoácidos para anticuerpos agonistas OX40 relacionados con Hu106-222.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:94 región variable de la cadena pesada para Hu106-222	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:95 región variable de la cadena ligera para Hu106-222	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:96 cadena pesada CDR1 para Hu106-222	DYSMH	5
SEQ ID N.º:97 cadena pesada CDR2 para Hu106-222	WINTETGEPT YADDFKG	17
SEQ ID N.º:98 cadena pesada CDR3 para Hu106-222	PYYDYVSYYA MDY	13
SEQ ID N.º:99 cadena ligera CDR1 para Hu106-222	KASQDVSTAV A	11
SEQ ID N.º:100 cadena ligera CDR2 para Hu106-222	SASYLYT	7
SEQ ID N.º:101 cadena ligera CDR3 para Hu106-222	QQHYSTPRT	9

[0398] En algunas realizaciones, el anticuerpo agonista OX40 es MEDI6469 (también denominado 9B12). MEDI6469 es un anticuerpo monoclonal murino. Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575-585. En algunas realizaciones el agonista OX40 es un anticuerpo producido por el hibridoma 9B12, depositado en Biovest Inc. (Malvern, MA, EE.UU.), como se describe en Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575-585. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias CDR de MEDI6469. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera de MEDI6469.

[0399] En una realización, el agonista OX40 es L106 BD (Pharmingen Producto #340420). En algunas realizaciones, el agonista OX40 comprende las CDR del anticuerpo L106 (BD Pharmingen Producto #340420). En algunas realizaciones, el agonista OX40 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo L106 (BD Pharmingen Producto #340420). En una realización, el agonista OX40 es ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo #20073). En algunas realizaciones, el agonista OX40 comprende las CDR del anticuerpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo #20073). En algunas realizaciones, el agonista OX40 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo #20073). En una realización, el agonista OX40 es el anticuerpo monoclonal murino anti-mCD134/mOX40 (clon OX86), disponible comercialmente en InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NH.

[0400] En una realización, el agonista OX40 se selecciona de entre los agonistas OX40 descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 95/12673, WO 95/21925, WO 2006/121810, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/038191, y WO 2014/148895; Solicitud de Patente Europea EP 0672141; Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 y US 2015/132288 (incluidos los clones 20E5 y 12H3); y Patentes de EE.UU. N.º 7,504,101, 7,550,140, 7,622,444, 7,696,175, 7,960,515, 7,961,515, 8,133,983, 9,006,399, y 9,163,085.

[0401] En una realización, el agonista OX40 es una proteína de fusión agonista OX40 como se representa en la Estructura I-A (proteína de fusión fragmento Fc-anticuerpo C-terminal) o Estructura I-B (proteína de fusión fragmento Fc-anticuerpo N-terminal), o un fragmento, derivado, conjugado, variante, o biosimilar de la misma. Las propiedades de las estructuras I-A e I-B se describen anteriormente y en Patentes de EE.UU. N.º 9,359,420, 9,340,599, 8,921,519, y 8,450,460. Las secuencias de aminoácidos de los dominios polipeptídicos de la estructura I-A figuran en la Tabla GG. El dominio Fc comprende preferentemente un dominio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID N.º:31) el dominio bisagra completo (aminoácidos 1-16 de SEQ ID N.º:31) o una porción del dominio bisagra (*por ejemplo*, aminoácidos 4-16 de SEQ ID N.º:31). Los enlazadores preferidos para conectar un anticuerpo Fc C-terminal pueden seleccionarse a partir de las formas de realización dadas en SEQ ID N.º:32 a SEQ ID N.º:41, incluyendo enlazadores adecuados para la fusión de polipéptidos adicionales. Asimismo, las secuencias de aminoácidos de los dominios polipeptídicos de la estructura I-B se indican en la Tabla HH. Si se fusiona un fragmento de anticuerpo Fc con el extremo N-terminal de una proteína de fusión TNRFSF como en la estructura I-B, la secuencia del módulo Fc es preferiblemente la que se muestra en SEQ ID N.º:42, y las secuencias enlazadoras se seleccionan preferiblemente de entre las realizaciones expuestas en SED ID N.º:43 a SEQ ID N.º:45.

[0402] En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión de OX40 seleccionados del grupo que consiste en una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de tavolixizumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de 11D4, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de 18D8, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de Hu119-122, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de Hu106-222, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable seleccionadas de las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables descritas en la Tabla OO, cualquier combinación de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de las anteriores, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, y biosimilares de las mismas.

[0403] En una realización, una proteína de fusión agonista OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión OX40 que comprenden una secuencia OX40L. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que comprenden una secuencia según SEQ ID N.º:102. En una realización, una proteína de fusión agonista OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión OX40 que comprenden una secuencia OX40L soluble. En una realización, una proteína de fusión agonista OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión OX40 que comprenden una secuencia según SEQ ID N.º: 103. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que comprenden una secuencia según SEQ ID N.º:104.

[0404] En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un

95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias V_H y V_L dadas en la Tabla 18, en la que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador.

TABLA 18: Dominios polipeptídicos adicionales útiles como dominios de unión a OX40 en proteínas de fusión (por ejemplo, estructuras I-A y I-B) o como anticuerpos agonistas de OX40 scFv.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ	60
	SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ	120
	KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF	180
	CVL	183
SEQ ID N.º:103 OX40L dominio soluble	SRFYERIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE	60
	VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL	120
	IHQNPGEFCV L	131
SEQ ID N.º:104 OX40L dominio soluble (alternativo)	YFRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI	60
	SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ	120
	NPGEFCVL	128
SEQ ID N.º:105 cadena pesada variable para 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYDMNWVRQA PGKGLEWVSA IGSSGGSTYY	60
	ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR YSQVEVALDY WGQGTLVTVS	120
SEQ ID N.º:106 cadena ligera variable para 008	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA	60
	SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQVYNNP TTFGQGTK	108
SEQ ID N.º:107 cadena pesada variable para 011	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD	60
	SVKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNSLRAEDTA VYYCARDRYF PQGNAFDYWG QGTLVTVSS	120
SEQ ID N.º:108 cadena ligera variable para 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA	60
	SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQVYNNP TTFGQGTK	108
SEQ ID N.º:109 cadena pesada variable para 021	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY	60
	ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS	120
SEQ ID N.º:110 cadena ligera variable para 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGINYLDW YLQMPGQSPQ LLIYLGSNRA	60
	SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP FTFGQGTK	108
SEQ ID N.º:111 cadena pesada variable para 023	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA	60
	DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDH VMGLYNFQYW GQGTLVTVSS	120
SEQ ID N.º:112 cadena ligera variable para 023	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD AGNRATGIPA	60
	RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	108
SEQ ID N.º:113 región variable de la cadena pesada	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYIFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY	60
	NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLDMDYWG QGTSVTVSS	119
SEQ ID N.º:114 región variable de la cadena ligera	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS	60
	RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	108
SEQ ID N.º:115 región variable de la cadena pesada	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKYSGYTFT DYTMNWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY	60
	NQNFKGKATL TVDKSSSTAY MDFRSLTSED SAVYYCARNG YHGFHLDFDV WGAGTTVTVS	120
	S	121
SEQ ID N.º:116 región variable de la cadena ligera	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD	60
	RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	108
SEQ ID N.º:117 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMNWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY	60
	ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANFY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV	120
	SS	122

(continuación)

SEQ ID N.º:118 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY	60
	ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCARFY YDIVSYYAMD YWGQGTTVTV	120
	SS	122
SEQ ID N.º:119 región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD	60
	RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	107
SEQ ID N.º:120 región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD	60
	RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	107
SEQ ID N.º:121 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCSSNEYEFP SMDWSWVRET PEKRLELVAA INGDGGSTYY	60
	PDTMERFII SRDNTKNILY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	120
SEQ ID N.º:122 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SMDWSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY	60
	PDTMERFII SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	120
SEQ ID N.º:123 región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES	60
	GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEEDDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	111
SEQ ID N.º:124 región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES	60
	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	111
SEQ ID N.º:125 región variable de la cadena pesada	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP	60
	EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG	120
	EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	138
SEQ ID N.º:126 región variable de la cadena ligera	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGNVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP	60
	GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG	120
	TKLELK	126

[0405] En una realización, el agonista de OX40 es un polipéptido de fusión de cadena simple agonista de OX40 que comprende (i) un primer dominio soluble de unión a OX40, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio soluble de unión a OX40, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio soluble de unión a OX40, que comprende además un dominio adicional en el extremo N-terminal y/o C-terminal, y en el que el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc. En una realización, el agonista de OX40 es un polipéptido de fusión de cadena simple agonista de OX40 que comprende (i) un primer dominio soluble de unión a OX40, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio soluble de unión a OX40, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio soluble de unión a OX40, que comprende además un dominio adicional en el extremo N-terminal y/o C-terminal, en el que el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc en el que cada uno de los dominios solubles de unión a OX40 carece de una región peduncular (que contribuye a la trimerización y proporciona una cierta distancia a la membrana celular, pero no forma parte del dominio de unión a OX40) y el primer y el segundo enlazador peptídico tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos.

[0406] En una realización, el agonista de OX40 es un polipéptido de fusión de cadena simple agonista de OX40 que comprende (i) un primer dominio de citocina de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de citocina de la superfamilia del TNF soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio soluble de citocina de la superfamilia TNF, en el que cada uno de los dominios solubles de citocina de la superfamilia TNF carece de una región peduncular y el primer y el segundo enlazador peptídico tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos, y donde el dominio de citocina de la superfamilia TNF es un dominio de unión a OX40.

[0407] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es MEDI6383. MEDI6383 es una proteína de fusión agonista de OX40 y puede prepararse como se describe en Patente de EE.UU. N.º 6,312,700.

[0408] En una realización, el agonista de OX40 es un anticuerpo scFv agonista de OX40 que comprende cualquiera de

los dominios V_H anteriores unido a cualquiera de los dominios V_L anteriores.

[0409] En una realización, el agonista OX40 es el anticuerpo monoclonal agonista OX40 de Creative Biolabs MOM-18455, disponible comercialmente de Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, USA.

[0410] En una realización, el agonista OX40 es el anticuerpo agonista OX40 clon Ber-ACT35 comercialmente disponible de BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA.

H. Análisis Opcionales de Viabilidad Celular

[0411] Opcionalmente, un ensayo de viabilidad celular puede ser realizado después de la primera expansión (algunas veces referida como la expansión inicial a granel), usando ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de exclusión con azul tripán en una muestra de TIL, que marca selectivamente las células muertas y permite evaluar la viabilidad. Otros ensayos para comprobar la viabilidad pueden ser, entre otros, el ensayo del azul de Alamar; y el ensayo MTT.

1. Recuento de células, Viabilidad, Citometría de flujo

[0412] En algunas realizaciones, se miden los recuentos celulares y/o la viabilidad. La expresión de marcadores tales como, entre otros, CD3, CD4, CD8, y CD56, así como cualquier otro divulgado o descrito en el presente documento, puede medirse mediante citometría de flujo con anticuerpos, por ejemplo, entre otros, los disponibles comercialmente en BD Bio-sciences (BD Biosciences, San Jose, CA) utilizando un citómetro de flujo FACSCanto™ (BD Biosciences). Las células pueden contarse manualmente utilizando un hemocitómetro desechable c-chip (VWR, Batavia, IL) y la viabilidad puede evaluarse utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, la tinción con azul tripán. La viabilidad celular también puede ensayarse basándose en USSN 15/863,634.

[0413] En algunos casos, la población a granel de TIL puede ser criopreservada inmediatamente, usando los protocolos discutidos a continuación. Alternativamente, la población de TIL a granel puede someterse a REP y luego criopreservarse como se explica a continuación. Del mismo modo, en el caso de que los TIL modificados genéticamente vayan a utilizarse en terapia, las poblaciones de TIL a granel o REP pueden someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados.

[0414] Según la presente divulgación, un método para ensayar TILs para viabilidad y/o uso adicional en administración a un sujeto. En algunas realizaciones, el método para el ensayo de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) comprende:

(i) obtención de una primera población de TIL;

(ii) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultura celular que comprenda IL-2, y opcionalmente OKT-3, para producir una segunda población de TIL; y

(iii) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultura celular de la segunda población de TIL con IL-2 adicional, OKT-3, y células presentadoras de antígeno (APCs), para producir una tercera población de TIL, donde la tercera población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la segunda población de TIL;

(iv) recolección, lavado, y crioconservación de la tercera población de TIL;

(v) almacenar los TIL crioconservados a una temperatura criogénica;

(vi) descongelar la tercera población de TIL para proporcionar una tercera población descongelada de TIL; y

(vii) realizar una segunda expansión adicional de una porción de la tercera población descongelada de TIL suplementando el medio de cultura celular de la tercera población con IL-2, OKT-3, y APCs durante un periodo de expansión adicional (a veces denominado periodo de reREP) de al menos 3 días, donde la tercera expansión se realiza para obtener una cuarta población de TIL, donde el número de TIL en la cuarta población de TIL se compara con el número de TIL en la tercera población de TIL para obtener una proporción;

(viii) determinar, basándose en la relación de la etapa (vii), si la población descongelada de TIL es adecuada para su administración a un paciente;

(ix) administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la tercera población descongelada de TIL al paciente cuando se determina que la relación entre el número de TIL en la cuarta población de TIL y el número de TIL en la tercera población de TIL es superior a 5:1 en la etapa (viii).

[0415] En algunas realizaciones, los TIL son ensayados para viabilidad después de la etapa (vii).

[0416] La presente divulgación también proporciona métodos adicionales para ensayar TILs. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para ensayar TILs que comprende:

(i) obtención de una porción de una primera población de TIL criopreservados;

(ii) descongelar la porción de la primera población de TIL criopreservados;

(iii) realizar una primera expansión cultivando la porción de la primera población de TIL en un medio de cultura celular que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígenos (APC) durante un período de expansión adicional (a veces denominado período reREP) de al menos 3 días, para producir una segunda población de TIL, donde la porción de la primera población de TIL se compara con la segunda población de TIL para obtener una relación del número de TIL, donde la relación del número de TIL en la segunda población de TIL con el número de TIL en la porción de la primera población de TIL es mayor que 5:1;

(iv) determinar, basándose en la proporción de la etapa (iii), si la primera población de TIL es adecuada para su uso en la administración terapéutica a un paciente;

(v) determinar que la primera población de TIL es adecuada para su uso en la administración terapéutica cuando se determina que la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es superior a 5:1 en la etapa (iv).

[0417] En algunas realizaciones, la relación del número de TILs en la segunda población de TILs al número de TILs en la porción de la primera población de TILs es mayor que 50:1.

[0418] En algunas realizaciones, el método comprende además realizar la expansión de toda la primera población de TIL criopreservados de la etapa (i) según los métodos descritos en cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento.

[0419] En algunas realizaciones, el método comprende además administrar toda la primera población de TIL criopreservados de la etapa (i) al paciente.

2. Cultivos celulares

[0420] En una realización, un método para expandir TILs, incluyendo aquellos discutidos anteriormente así como ejemplificados en la Figura 1, puede incluir el uso de aproximadamente 5,000 mL a aproximadamente 25,000 mL de medio celular, aproximadamente 5,000 mL a aproximadamente 10,000 mL de medio celular, o aproximadamente 5,800 mL a aproximadamente 8,700 mL de medio celular. En algunas realizaciones, el medio es un medio libre de suero. En algunas realizaciones, el medio de la primera expansión no contiene suero. En algunas realizaciones, el medio de la segunda expansión está libre de suero... En algunas realizaciones, los medios de la primera expansión y de la segunda están ambos libres de suero. En una realización, la expansión del número de TILs no utiliza más de un tipo de medio de cultivo celular. Puede utilizarse cualquier medio de cultivo celular adecuado, *por ejemplo*, el medio de cultivo celular AIM-V (L-glutamina, 50 µM de sulfato de estreptomicina y 10 µM de sulfato de gentamicina (Invitrogen, Carlsbad CA). En este sentido, los métodos inventivos reducen ventajosamente la cantidad de medio y el número de tipos de medio necesarios para ampliar el número de TIL. En una realización, la expansión del número de TIL puede comprender la alimentación de las células con una frecuencia no superior a cada tercer o cuarto día. La ampliación del número de células en un contenedor permeable al gas simplifica los procedimientos necesarios para ampliar el número de células al reducir la frecuencia de alimentación necesaria para ampliar las células.

[0421] En una realización, el medio celular en el primer y/o segundo contenedor permeable al gas no está filtrado. El uso de un medio celular no filtrado puede simplificar los procedimientos necesarios para ampliar el número de células. En una realización, el medio celular en el primer y/o segundo contenedor permeable al gas carece de beta-mercaptoetanol (BME).

[0422] En una divulgación proporcionada en el presente documento pero no reivindicada, la duración del método comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable al gas que contiene medio celular en el mismo; obtener TIL de la muestra de tejido tumoral; expandir el número de TIL en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular durante una duración de aproximadamente 7 a 14 días, *por ejemplo*, aproximadamente 11 días. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, el pre-REP es de aproximadamente 7 a 14 días, *por ejemplo*, aproximadamente 11 días. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento pero no reivindicadas, REP es de aproximadamente 7 a 14 días, *por ejemplo*, aproximadamente 11 días.

[0423] En una realización, los TIL se expanden en contenedores permeables al gas. Se han utilizado contenedores permeables al gas para expandir TILs utilizando PBMCs mediante métodos, composiciones, y dispositivos conocidos en

la técnica, incluidos los descritos en Publicación de solicitud de patente de EE. UU n.º 2005/0106717 A1. En una realización, los TIL se expanden en bolsas permeables al gas. En una realización, los TIL se expanden utilizando un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables al gas, como el Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). En una realización, los TIL se expanden utilizando un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables al gas, como el WAVE Bioreactor System, también conocido como Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). En una realización, el sistema de expansión celular incluye una bolsa celular permeable al gas con un volumen seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente aproximadamente 100 ml, aproximadamente 200 ml, aproximadamente 300 ml, aproximadamente 400 ml, aproximadamente 500 ml, aproximadamente 600 ml, aproximadamente 700 ml, aproximadamente 800 ml, aproximadamente 900 ml, aproximadamente 1 l, aproximadamente 2 l, aproximadamente 3 l, aproximadamente 4 l, aproximadamente 5 l, aproximadamente 6 l, aproximadamente 7 l, aproximadamente 8 l, aproximadamente 9 l, y aproximadamente 10 l.

[0424] En una realización, los TIL pueden ser expandidos en frascos G-Rex (comercialmente disponibles de Wilson Wolf Manufacturing). Tales realizaciones permiten que las poblaciones celulares se expandan desde aproximadamente 5×10^5 células/cm^2 hasta entre 10×10^6 y 30×10^6 células/cm^2. En una realización esto es sin alimentación. En una realización, esto es sin alimentación mientras el medio resida a una altura de unos 10 cm en el matraz G-Rex. En una realización, esto es sin alimentación pero con la adición de una o más citoquinas. En una realización, la citoquina puede añadirse como un bolo sin necesidad de mezclar la citoquina con el medio. Dichos recipientes, dispositivos y métodos son conocidos en la técnica y se han utilizado para expandir TILs, e incluyen los descritos en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2014/0377739A1, publicación internacional de EE.UU. n.º WO 2014/210036 A1, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º us 2013/0115617 A1, publicación internacional de EE.UU. n.º WO 2013/188427 A1, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2011/0136228 A1, Patente de EE.UU. n.º US 8,809,050 B2, Publicación internacional n.º WO 2011/072088 A2, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2016/0208216 A1, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2012/0244133 A1, Publicación internacional n.º WO 2012/129201 A1, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2013/0102075 A1, Patente de EE.UU. n.º US 8,956,860 B2, Publicación internacional n.º WO 2013/173835 A1, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2015/0175966 A1. Tales procesos también se describen en Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292.

I. Ingeniería Genética Opcional de TIL

[0425] En algunas realizaciones, los TIL son opcionalmente modificados genéticamente para incluir funcionalidades adicionales, incluyendo, pero no limitadas a, un receptor de células T de alta afinidad (TCR), *por ej,* un TCR dirigido a un antígeno asociado a tumor como MAGE-1, HER2, o NY-ESO-1, o un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a una molécula de superficie celular asociada a tumor (*por ejemplo,* mesotelina) o molécula de superficie celular restringida a linaje (*por ejemplo,* CD19).

J. Criopreservación Opcional de TILs

[0426] Como se discutió anteriormente, y ejemplificado en las Etapas A a E como se proporciona en la Figura 1, la criopreservación puede ocurrir en numerosos puntos a lo largo del proceso de expansión de TIL. En algunas realizaciones, la población expandida de TILs después de la segunda expansión (como se proporciona, por ejemplo, según la Etapa D de la Figura 1) puede criopreservarse. La criopreservación puede realizarse generalmente colocando la población de TIL en una solución de congelación, *por ejemplo*, 85% de suero AB inactivado con complemento y 15% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las células en solución se colocan en viales criogénicos y se almacenan durante 24 horas a -80 °C, con transferencia opcional a congeladores de nitrógeno gaseoso para su criopreservación. See Sadeghi, et al.,. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan en DMSO al 5%. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan en medios de cultura celular más 5% de DMSO. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan de acuerdo con los métodos proporcionados en los Ejemplos F y G.

[0427] Cuando sea apropiado, las células son removidas del congelador y descongeladas en un baño de agua a 37 °C hasta que aproximadamente 4/5 de la solución esté descongelada. Por lo general, las células se resuspenden en medios completos y, opcionalmente, se lavan una o más veces. En algunas realizaciones, los TIL descongelados pueden contarse y evaluarse para determinar su viabilidad como se conoce en la técnica.

K. Sistemas Cerrados para la Fabricación de TIL

[0428] La presente invención prevé el uso de sistemas cerrados durante el proceso de cultivo de TIL. Estos sistemas cerrados permiten prevenir y/o reducir la contaminación microbiana, utilizar menos matraces y reducir costes. En algunas realizaciones, el sistema cerrado utiliza dos contenedores.

[0429] Tales sistemas cerrados son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm y https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.

[0430] Los dispositivos de conexión estériles (STCD) producen soldaduras estériles entre dos piezas de tubos

compatibles. Este procedimiento permite la conexión estéril de diversos recipientes y diámetros de tubo. En algunas realizaciones, los sistemas cerrados incluyen sistemas luer lock y termosellados como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo G. En algunas realizaciones, se accede al sistema cerrado mediante jeringas en condiciones estériles para mantener la esterilidad y la naturaleza cerrada del sistema. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado como el descrito en el Ejemplo G. En algunas realizaciones, los TIL se formulan en un recipiente de formulación final del producto según el método descrito en el Ejemplo G, sección "Formulación final y llenado".

[0431] En algunas realizaciones, el sistema cerrado utiliza un contenedor desde el momento en que se obtienen los fragmentos tumorales hasta que los TIL están listos para ser administrados al paciente o criopreservados. En algunas realizaciones cuando se utilizan dos contenedores, el primer contenedor es un contenedor G cerrado y la población de TILs se centrifuga y se transfiere a una bolsa de infusión sin abrir el primer contenedor G cerrado. En algunas realizaciones, cuando se utilizan dos contenedores, la bolsa de infusión es una bolsa de infusión que contiene HypoThermosol. Un sistema cerrado o sistema cerrado de cultura de células TIL se caracteriza porque una vez que se ha añadido la muestra tumoral y/o los fragmentos tumorales, el sistema se sella herméticamente desde el exterior para formar un entorno cerrado libre de la invasión de bacterias, hongos, y/o cualquier otra contaminación microbiana.

[0432] En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana está comprendida entre aproximadamente 5% y aproximadamente 100%. En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana se sitúa entre aproximadamente 5% y aproximadamente 95%. En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana se sitúa entre aproximadamente 5% y aproximadamente 90%. En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana se sitúa entre aproximadamente 10% y aproximadamente 90%. En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana se sitúa entre aproximadamente 15% y aproximadamente 85%. En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana es de aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, o 100%.

[0433] El sistema cerrado permite el crecimiento de TIL en ausencia y/o con una reducción significativa de la contaminación microbiana.

[0434] Además, el pH, la presión parcial de dióxido de carbono y la presión parcial de oxígeno del entorno de cultivo de células TIL varían a medida que se cultivan las células. Por consiguiente, aunque se haga circular un medio apropiado para la cultura celular, el entorno cerrado debe mantenerse constantemente como un entorno óptimo para la proliferación de TIL. Para ello, es deseable que los factores físicos de pH, presión parcial de dióxido de carbono y presión parcial de oxígeno dentro del líquido de cultivo del entorno cerrado se controlen mediante un sensor, cuya señal se utilice para controlar un intercambiador de gas instalado en la entrada del entorno de cultivo, y que la presión parcial de gas del entorno cerrado se ajuste en tiempo real en función de los cambios en el líquido de cultivo para optimizar el entorno de cultivo celular. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un sistema de cultivo celular cerrado que incorpora en la entrada al entorno cerrado un intercambiador de gases equipado con un dispositivo de monitorización que mide el pH, la presión parcial de dióxido de carbono y la presión parcial de oxígeno del entorno cerrado, y optimiza el entorno de cultivo celular ajustando automáticamente las concentraciones de gas basándose en las señales del dispositivo de monitorización.

[0435] En algunas realizaciones, la presión dentro del ambiente cerrado es controlada continua o intermitentemente. Es decir, la presión en el entorno cerrado puede variarse mediante un dispositivo de mantenimiento de la presión, por ejemplo, garantizando así que el espacio sea adecuado para el crecimiento de los TIL en un estado de presión positiva, o promoviendo la exudación de fluido en un estado de presión negativa y promoviendo así la proliferación celular. Además, aplicando presión negativa de forma intermitente, es posible sustituir de forma uniforme y eficaz el líquido circulante en el entorno cerrado mediante una contracción temporal del volumen del entorno cerrado.

[0436] En algunas realizaciones, los componentes de cultivo óptimos para la proliferación de los TILs pueden ser sustituidos o añadidos, e incluyendo factores tales como IL-2 y/o OKT3, así como la combinación, pueden ser añadidos.

L. Criopreservación Opcional de TILs

[0437] Opcionalmente, se puede criopreservar la población de TIL masiva o la población expandida de TIL. En algunas realizaciones, la criopreservación se produce en la población terapéutica de TIL. En algunas realizaciones, la criopreservación se produce en los TIL recolecciónd os después de la segunda expansión. En algunas realizaciones, la criopreservación tiene lugar en los TIL en la Etapa F ejemplar de la Figura 1. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan en la bolsa de infusión. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan antes de colocarlos en una bolsa de infusión. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan y no se colocan en una bolsa de infusión. En algunas realizaciones, la criopreservación se lleva a cabo utilizando un medio de criopreservación. En algunas realizaciones, el medio de criopreservación contiene dimetilsulfóxido (DMSO). Esto se consigue generalmente poniendo la población de TIL en una solución de congelación, por ejemplo, 85% de suero AB inactivado por complemento y 15% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las células en solución se colocan en viales criogénicos y se almacenan durante 24 horas a -80 °C, con transferencia opcional a congeladores de nitrógeno gaseoso para su criopreservación. See, Sadeghi, et al.,.

[0438] Cuando sea apropiado, las células son removidas del congelador y descongeladas en un baño de agua a 37 °C

hasta que aproximadamente 4/5 de la solución esté descongelada. Por lo general, las células se resuspenden en medios completos y, opcionalmente, se lavan una o más veces. En algunas realizaciones, los TIL descongelados pueden contarse y evaluarse para determinar su viabilidad como se conoce en la técnica.

[0439] En una realización preferida, una población de TIL es criopreservada usando el medio de criopreservación CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). En una realización preferida, una población de TILs se criopreserva utilizando un medio de criopreservación que contiene dimetilsulfóxido (DMSO). En una realización preferida, una población de TIL se criopreserva utilizando una proporción 1:1 (vol:vol) de CS10 y medio de cultura celular. En una realización preferida, una población de TIL se criopreserva utilizando una proporción de aproximadamente 1:1 (vol:vol) de CS10 y medio de cultura celular, que comprende además IL-2 adicional.

[0440] Como se discutió anteriormente en las Etapas A a E, la criopreservación puede ocurrir en numerosos puntos a lo largo del proceso de expansión de TIL. En algunas realizaciones, la población masiva de TIL después de la primera expansión según la Etapa B o la población expandida de TIL después de la una o más segundas expansiones según la Etapa D pueden criopreservarse. La criopreservación puede realizarse generalmente colocando la población de TIL en una solución de congelación, *por ejemplo*, 85% de suero AB inactivado con complemento y 15% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las células en solución se colocan en viales criogénicos y se almacenan durante 24 horas a -80 °C, con transferencia opcional a congeladores de nitrógeno gaseoso para su criopreservación. Véase Sadeghi, et al.,.

[0441] Cuando sea apropiado, las células son removidas del congelador y descongeladas en un baño de agua a 37 °C hasta que aproximadamente 4/5 de la solución esté descongelada. Por lo general, las células se resuspenden en medios completos y, opcionalmente, se lavan una o más veces. En algunas realizaciones, los TIL descongelados pueden contarse y evaluarse para determinar su viabilidad como se conoce en la técnica.

[0442] En algunos casos, la población TIL de la Etapa B puede ser criopreservada inmediatamente, usando los protocolos discutidos abajo. Alternativamente, la población de TIL a granel puede someterse al Etapa C y al Etapa D y luego criopreservarse después de la Etapa D. De manera similar, en el caso en que los TIL modificados genéticamente se utilizarán en terapia, las poblaciones de TIL de la Etapa B o de la Etapa D pueden someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados.

IV. Procesos de Fabricación TIL (Realizaciones de procesos GEN3, que incluyen opcionalmente medios definidos)

[0443] Sin estar limitado a ninguna teoría en particular, se cree que la primera expansión de cebado que ceba una activación de células T seguida por la segunda expansión rápida que potencia la activación de células T como se describe en los métodos de la invención permite la preparación de células T expandidas que retienen un fenotipo "más joven", y como tal se espera que las células T expandidas de la invención exhiban mayor citotoxicidad contra células cancerosas que las células T expandidas por otros métodos. En particular, se cree que una activación de células T que se prepara mediante la exposición a un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT-3), IL-2 y opcionalmente células presentadoras de antígeno (APC) y luego se potencia mediante la exposición posterior a un anticuerpo anti-CD-3 adicional (por ejemplo, OKT-3), IL-2 y APC como se enseña en los métodos de la invención limita o evita la maduración de células T en cultivo, lo que produce una población de células T con un fenotipo menos maduro, cuyas células T se agotan menos por la expansión en cultivo y exhiben una mayor citotoxicidad contra las células cancerosas. En algunas realizaciones, la etapa de segunda expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr una ampliación del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y luego (b) efectuar la transferencia de las células T en el cultivo a pequeña escala a un segundo recipiente más grande que el primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 500MCS, y cultivar las células T del cultivo a pequeña escala en un cultivo a mayor escala en el segundo recipiente durante un período de aproximadamente 4 a 7 días. En algunas realizaciones, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalamiento del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando células T en un primer cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y luego (b) efectuar la transferencia y distribución de las células T del primer cultivo a pequeña escala hacia y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos recipientes que son iguales en tamaño al primer recipiente, en donde en cada segundo recipiente la porción de las células T del primer cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala durante un período de aproximadamente 4 a 7 días. En algunas realizaciones, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalamiento horizontal y vertical del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y luego (b) efectuar la transferencia y distribución de las células T del cultivo a pequeña escala hacia y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos recipientes que son más grandes que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, donde en cada segundo recipiente la porción de las células T del cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala por un período de aproximadamente 4 a 7 días. En algunas realizaciones, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalamiento horizontal y vertical del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 4 días, y luego (b) efectuar la transferencia y

repartición de las células T del cultivo a pequeña escala hacia y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de las células T del cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 5 días.

[0444] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida se lleva a cabo después de que la activación de las células T efectuada por la primera expansión de cebado comienza a disminuir, disminuir, decaer o disminuir.

[0445] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida se lleva a cabo después de que la activación de células T efectuada por la primera expansión de cebado ha disminuido en o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100%.

[0446] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida se lleva a cabo después de que la activación de células T efectuada por la primera expansión de cebado ha disminuido en un porcentaje en el intervalo de en o aproximadamente 1% a 100%.

[0447] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida se lleva a cabo después de que la activación de las células T efectuada por la primera expansión de cebado ha disminuido en un porcentaje en el intervalo de 1% a 10%, 10% a 20%, 20% a 30%, 30% a 40%, 40% a 50%, 50% a 60%, 60% a 70%, 70% a 80%, 80% a 90%, o 90% a 100%.

[0448] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida se lleva a cabo después de que la activación de las células T efectuada por la primera expansión de cebado ha disminuido al menos en o alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99%.

[0449] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida se lleva a cabo después de que la activación de las células T efectuada por la primera expansión de cebado ha disminuido hasta en o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%.

[0450] En algunas realizaciones, la disminución en la activación de células T efectuada por la primera expansión de cebado se determina por una reducción en la cantidad de interferón gamma liberado por las células T en respuesta a la estimulación con antígeno.

[0451] En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado de células T se realiza durante un período de hasta en o alrededor de 7 días o alrededor de 8 días.

[0452] En algunas realizaciones, la primera expansión de células T se lleva a cabo durante un periodo de hasta 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, u 8 días.

[0453] En algunas realizaciones, la primera expansión de células T se realiza durante un periodo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, u 8 días.

[0454] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida de células T se lleva a cabo durante un período de hasta en o alrededor de 11 días.

[0455] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida de células T se lleva a cabo durante un período de hasta en o aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, u 11 días.

[0456] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida de células T se realiza durante un período de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, u 11 días.

[0457] En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado de células T se realiza durante un periodo de entre 1 día y 7 días y la segunda expansión rápida de células T se realiza durante un periodo de entre 1 día y 11 días.

[0458] En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado de células T se realiza durante un período de hasta en o aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, u 8 días y la segunda expansión rápida de células T se realiza durante un período de hasta en o aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, u 11 días.

[0459] En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado de células T se realiza durante un periodo de entre 1 día y 8 días y la segunda expansión rápida de células T se realiza durante un periodo de entre 1 día y 9 días.

[0460] En algunas realizaciones, la primera expansión de células T de cebado se realiza durante un período de 8 días y la segunda expansión rápida de células T se realiza durante un período de 9 días.

[0461] En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado de células T se realiza durante un periodo de entre 1 día y 7 días y la segunda expansión rápida de células T se realiza durante un periodo de entre 1 día y 9 días.

[0462] En algunas realizaciones, la primera expansión de células T de cebado se realiza durante un período de 7 días y la segunda expansión rápida de células T se realiza durante un período de 9 días.

[0463] En algunas realizaciones, las células T son linfocitos infiltrantes de tumores (TIL).

[0464] Las células T pueden ser linfocitos infiltrantes de médula ósea (MIL).

[0465] Las células T pueden ser linfocitos de sangre periférica (PBL).

[0466] En algunas realizaciones, las células T se obtienen de un donante que padece cáncer.

[0467] En algunas realizaciones, las células T son TIL obtenidos de un tumor extirpado de un paciente que sufre de cáncer.

[0468] Las células T pueden ser MILs obtenidas de la médula ósea de un paciente que sufre de una malignidad hematológica.

[0469] Las células T pueden ser PBLs obtenidas de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de un donante. En algunas realizaciones, el donante padece cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [HNSCC]), glioblastoma (incluido GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal, y carcinoma de células renales. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [HNSCC]), glioblastoma (incluido GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal, y carcinoma de células renales. En algunas realizaciones, el donante padece un tumor. El tumor puede ser líquido. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor sólido. El donante puede padecer una neoplasia hematológica.

[0470] En ciertos aspectos de la presente divulgación, las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre extraída de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por el artesano experto, como la separación FICOLL. En un aspecto preferido, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis suele contener linfocitos, incluidas células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos, y plaquetas. En un aspecto, las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción plasmática y, opcionalmente, colocar las células en un tampón o medio apropiado para las etapas de procesamiento posteriores. En una realización, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos cationes divalentes, si no de todos. Las células T pueden aislarse a partir de linfocitos de sangre periférica lisando los glóbulos rojos y eliminando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL o por elutriación centrífuga a contracorriente.

[0471] Las células T pueden ser PBLs separados de sangre entera o producto de aféresis enriquecido para linfocitos de un donante. En algunas realizaciones, el donante padece cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [HNSCC]), glioblastoma (incluido GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal, y carcinoma de células renales. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [HNSCC]), glioblastoma (incluido GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal, y carcinoma de células renales. En algunas realizaciones, el donante padece un tumor. El tumor puede ser líquido. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor sólido. El donante puede padecer una neoplasia hematológica. Los PBL pueden aislarse a partir de sangre total o producto de aféresis enriquecido en linfocitos mediante métodos de selección positiva o negativa, es decir, eliminando los PBL utilizando un marcador o marcadores, por ejemplo, CD3+ CD45+, para el fenotipo de células T, o eliminando las células sin fenotipo de células T, dejando los PBL. Los PBL pueden aislarse mediante centrifugación en gradiente. Una vez aislados los PBL del tejido del donante, puede iniciarse la primera expansión de PBL sembrando un número adecuado de PBL aislados (en algunas realizaciones, aproximadamente 1×10^7 PBL) en el cultivo de primera expansión de acuerdo con la etapa de primera expansión de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

[0472] Un proceso TIL ejemplar conocido como proceso 3 (también denominado en el presente documento GEN3) que contiene algunas de estas características se representa en la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C), y algunas de las ventajas de esta realización de la presente invención sobre el proceso 2A se describen en las Figuras 1, 2, 30, y 31 (en particular, *p. ej.*, la Figura 8B y/o la Figura 8C). En las Figuras 1 y 30 se muestran dos realizaciones del proceso 3 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C). El proceso 2A o Gen 2 también se describe en Publicación de patente de EE.UU. n.º 2018/0280436.

[0473] Como se discute y generalmente se describe aquí, los TIL son tomadas de una muestra de un paciente y manipuladas para expandir su número antes del transplante a un paciente usando el proceso de expansión TIL descrito aquí y referido como Gen 3. En algunas realizaciones, los TIL pueden ser opcionalmente manipulados genéticamente como se discute a continuación. En algunas realizaciones, los TIL pueden criopreservarse antes o después de la expansión. Una vez descongelados, también pueden volver a estimularse para aumentar su metabolismo antes de la infusión en un paciente.

[0474] En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (incluidos los procesos denominados en el presente documento expansión pre-rápida (Pre-REP), así como los procesos mostrados en la Figura 8 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C) como Etapa B) se acorta a 1 a 8 días y la segunda expansión rápida (incluyendo procesos referidos aquí como Protocolo de Expansión Rápida (REP) así como procesos mostrados en la Figura 1 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C) como Etapa D) se acorta a 1 a 9 días, como se discute en detalle a continuación así como en los ejemplos y figuras. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (incluidos los procesos denominados en el presente documento preexpansión rápida (Pre-REP), así como los procesos mostrados en la Figura 1 (en particular, *p. ej.,* la Figura 8B y/o Figura 8C) como Etapa B) se acorta a 1 a 8 días y la segunda expansión rápida (incluidos los procesos denominados en el presente documento Protocolo de Expansión Rápida (REP), así como los procesos mostrados en la Figura 1 (en particular, p *. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C) como Etapa D) se acorta a 1 a 8 días, como se analiza en detalle a continuación, así como en los ejemplos y figuras. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (incluidos los procesos denominados en el presente documento preexpansión rápida (Pre-REP), así como los procesos mostrados en la Figura 1 (en particular, *p. ej.,* la Figura 8B y/o Figura 8C) como Etapa B) se acorta a 1 a 7 días y la segunda expansión rápida (incluidos los procesos denominados en el presente documento Protocolo de Expansión Rápida (REP), así como los procesos mostrados en la Figura 1 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C) como Etapa D) se acorta a 1 a 9 días, tal como se trata en detalle a continuación, así como en los ejemplos y figuras. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (incluidos los procesos denominados en el presente documento preexpansión rápida (Pre-REP), así como los procesos mostrados en la Figura 1 (en particular, *p. ej,* Figura 1B y/o Figura 8C) como Etapa B) es de 1 a 7 días y la segunda expansión rápida (incluidos los procesos denominados en el presente documento Protocolo de Expansión Rápida (REP), así como los procesos mostrados en la Figura 1 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C) como Etapa D) es de 1 a 10 días, como se explica en detalle a continuación, así como en los ejemplos y figuras. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C)) se acorta a 8 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa D en la Figura 1 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 7 a 9 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, *por ejemplo*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 8 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa D en la Figura 1 (en particular, *por ejemplo*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 8 a 9 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C)) se acorta a 7 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa D en la Figura 1 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 7 a 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 8 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C)) se acorta a 8 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa D en la Figura 8 (en particular, p*. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 8 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa D en la Figura 8 (en particular, por ejemplo, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 9 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 8 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa D en la Figura 8 (en particular, por ejemplo, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 10 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 7 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa D en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 7 a 10 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 7 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa D en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 8 a 10 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 7 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa D en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 9 a 10 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 8 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C)) se acorta a 7 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa D en la Figura 8 (en particular, *p. ej.*, Figura 8B y/o Figura 8C)) es de 7 a 9 días. En algunas realizaciones, la combinación de la primera expansión de cebado y la segunda expansión rápida (por ejemplo, las

expansiones descritas como Etapa B y Etapa D en la Figura 1 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 1B y/o la Figura 8C)) es de 14-16 días, como se discute en detalle a continuación y en los ejemplos y figuras. En particular, se considera que ciertas realizaciones de la presente invención comprenden una primera etapa de expansión de cebado en el que los TIL se activan mediante la exposición a un anticuerpo anti-CD3, *por ejemplo*, OKT-3 en presencia de IL-2 o la exposición a un antígeno en presencia de al menos IL-2 y un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, OKT-3. En ciertas realizaciones, los TIL que se activan en la primera etapa de expansión de cebado descrito anteriormente son una primera población de TIL, *es decir,* una población de células primarias.

[0475] Las Designaciones de "Etapa" A, B, C, *etc.,* a continuación son en referencia al ejemplo no limitante en la Figura 8 (en particular, por ejemplo, Figura 8B y/o Figura 8C) y en referencia a ciertas realizaciones no limitantes descritas aquí. La ordenación de las Etapas a continuación y en la Figura 8 (en particular, p. ej., Figura 8B y/o Figura 8C) es ejemplar y cualquier combinación u orden de etapas, así como etapas adicionales, repetición de etapas, y/u omisión de etapas está contemplada por la presente solicitud y los métodos aquí divulgados.

A. ETAPA A: Obtener una muestra del tumor del paciente

[0476] En general, los TIL se obtienen inicialmente de una muestra de tumor de paciente ("TILs primarios") o de linfocitos circulantes, tales como linfocitos de sangre periférica, incluyendo linfocitos de sangre periférica que tienen características similares a TIL, y luego se expanden en una población más grande para manipulación adicional como se describe aquí, opcionalmente criopreservados, y opcionalmente evaluados para fenotipo y parámetros metabólicos como una indicación de la salud de TIL.

[0477] Una muestra del tumor del paciente puede obtenerse utilizando métodos conocidos en la técnica, generalmente mediante resección quirúrgica, biopsia con aguja u otros medios para obtener una muestra que contenga una mezcla de células tumorales y células TIL. En general, la muestra tumoral puede proceder de cualquier tumor sólido, incluidos tumores primarios, tumores invasivos o tumores metastásicos. El tumor sólido puede ser de cáncer de pulmón no microcítico En algunas realizaciones, los TIL útiles se obtienen a partir de tumores de melanoma maligno, ya que se ha informado de que estos tienen niveles particularmente altos de TIL.

[0478] Una vez obtenida, la muestra tumoral es generalmente fragmentada usando disección aguda en pequeños pedazos de entre 1 a aproximadamente 8 mm^3, siendo particularmente útil de aproximadamente 2-3 mm^3. Los TIL se cultivan a partir de estos fragmentos utilizando digestiones tumorales enzimáticas. Tales digestiones tumorales pueden producirse por incubación en medios enzimáticos (*por ejemplo*, tampón 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), 2 mM de glutamato, 10 mcg/mL de gentamicina, 30 unidades/mL de DNasa y 1,0 mg/mL de colagenasa) seguida de disociación mecánica (*por ejemplo*, utilizando un disociador tisular). Los digeridos tumorales pueden producirse colocando el tumor en medios enzimáticos y disociando mecánicamente el tumor durante aproximadamente 1 minuto, seguido de incubación durante 30 minutos a 37 °C en 5% de CO_2, seguido de ciclos repetidos de disociación mecánica e incubación en las condiciones anteriores hasta que sólo queden pequeños trozos de tejido. Al final de este proceso, si la suspensión celular contiene un gran número de glóbulos rojos o células muertas, se puede realizar una separación en gradiente de densidad utilizando polisacárido hidrófilo ramificado FICOLL para eliminar estas células. Pueden utilizarse métodos alternativos conocidos en la técnica, como los descritos en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2012/0244133 A1. Cualquiera de los métodos anteriores puede utilizarse en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento para métodos de expansión de TIL o métodos de tratamiento de un cáncer.

[0479] Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, los TIL se derivan de tumores sólidos. Los tumores sólidos pueden no estar fragmentados. Los tumores sólidos pueden no estar fragmentados y se someten a digestión enzimática como tumores enteros. Los tumores pueden digerirse en una mezcla enzimática que comprenda colagenasa, DNasa, e hialuronidasa. Los tumores pueden digerirse en una mezcla enzimática compuesta por colagenasa, DNasa, e hialuronidasa durante 1-2 horas. Los tumores pueden digerirse en una mezcla enzimática que comprenda colagenasa, DNasa, e hialuronidasa durante 1-2 horas a 37°C, 5% CO_2. Los tumores pueden digerirse en una mezcla enzimática que comprenda colagenasa, DNasa, e hialuronidasa durante 1-2 horas a 37°C, 5% CO_2 con rotación. Los tumores pueden digerirse durante la noche con rotación constante. Los tumores pueden digerirse durante la noche a 37°C, 5% CO_2 con rotación constante. El tumor entero puede combinarse con las enzimas para formar una mezcla de reacción de digestión tumoral.

[0480] En algunas realizaciones, el tumor se reconstituye con las enzimas liofilizadas en un tampón estéril. En algunas realizaciones, el tampón es HBSS estéril.

[0481] La mezcla de enzimas puede comprender colagenasa. La colagenasa puede ser colagenasa IV. El caldo de trabajo para la colagenasa puede ser un caldo de trabajo 10X de 100 mg/ml.

[0482] La mezcla enzimática puede comprender ADNasa. El caldo de trabajo para la ADNasa puede ser un caldo de trabajo 10X de 10.000 UI/ml.

[0483] La mezcla enzimática puede comprender hialuronidasa. El caldo de trabajo para la hialuronidasa puede ser un caldo de trabajo de 10 mg/ml 10X.

[0484] La mezcla enzimática puede comprender 10 mg/ml de colagenasa, 1000 UI/ml de ADNasa, y 1 mg/ml de hialuronidasa.

[0485] La mezcla enzimática comprende 10 mg/ml de colagenasa, 500 UI/ml de ADNasa, y 1 mg/ml de hialuronidasa.

[0486] En general, la suspensión celular obtenida del tumor se denomina "población celular primaria" o "población celular recién obtenida" o "recién aislada". En ciertas realizaciones, la población celular de TILs recién obtenida se expone a un medio de cultura celular que comprende células presentadoras de antígeno, IL-12 y OKT-3.

[0487] En algunas realizaciones, la fragmentación incluye fragmentación física, incluyendo, por ejemplo, disección así como digestión. En algunas realizaciones, la fragmentación es física. En algunas realizaciones, la fragmentación es disección. En algunas realizaciones, la fragmentación es por digestión. En algunas realizaciones, los TIL pueden cultivarse inicialmente a partir de digestiones enzimáticas de tumores y fragmentos de tumores obtenidos de pacientes. En una realización, los TIL pueden cultivarse inicialmente a partir de digestiones enzimáticas de tumores y fragmentos de tumores obtenidos de pacientes.

[0488] En algunas realizaciones, donde el tumor es un tumor sólido, el tumor se somete a fragmentación física después de que la muestra del tumor se obtiene en, por ejemplo, la Etapa A (como se proporciona en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C)). En algunas realizaciones, la fragmentación se produce antes de la criopreservación. En algunas realizaciones, la fragmentación se produce después de la criopreservación. En algunas realizaciones, la fragmentación se produce tras la obtención del tumor y en ausencia de criopreservación. En algunas realizaciones, la etapa de fragmentación es un proceso *in vitro* o *ex vivo*. En algunas realizaciones, el tumor se fragmenta y se colocan 10, 20, 30, 40 o más fragmentos o piezas en cada contenedor para la primera expansión de cebado. En algunas realizaciones, el tumor se fragmenta y se colocan 30 o 40 fragmentos o piezas en cada contenedor para la primera expansión de cebado. En algunas realizaciones, el tumor se fragmenta y se colocan 40 fragmentos o trozos en cada contenedor para la primera expansión de cebado. En algunas realizaciones, los fragmentos múltiples comprenden de unos 4 a unos 50 fragmentos, donde cada fragmento tiene un volumen de unos 27 mm^3. En algunas realizaciones, los fragmentos múltiples comprenden de unos 30 a unos 60 fragmentos con un volumen total de unos 1300 mm^3 a unos 1500 mm^3. En algunas realizaciones, los fragmentos múltiples comprenden unos 50 fragmentos con un volumen total de unos 1350 mm^3. En algunas realizaciones, los fragmentos múltiples comprenden unos 50 fragmentos con una masa total de entre 1 gramo y 1,5 gramos. En algunas realizaciones, los fragmentos múltiples comprenden aproximadamente 4 fragmentos.

[0489] En algunas realizaciones, los TIL se obtienen a partir de fragmentos tumorales. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral se obtiene mediante disección cortante. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene entre 1 mm^3 y 10 mm^3 aproximadamente. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene entre 1 mm^3 y 8 mm^3 aproximadamente. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 1 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 2 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 3 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 4 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 5 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 6 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 7 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 8 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 9 mm^3. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral es de aproximadamente 10 mm^3. En algunas realizaciones, los fragmentos tumorales miden 1-4 mm × 1-4 mm × 1-4 mm. En algunas realizaciones, los fragmentos tumorales miden 1 mm × 1 mm × 1 mm. En algunas realizaciones, los fragmentos tumorales miden 2 mm × 2 mm × 2 mm. En algunas realizaciones, los fragmentos tumorales miden 3 mm × 3 mm × 3 mm. En algunas realizaciones, los fragmentos tumorales miden 4 mm × 4 mm × 4 mm.

[0490] En algunas realizaciones, los tumores se fragmentan para minimizar la cantidad de tejidos hemorrágicos, necróticos, y/o grasos en cada pieza. En algunas realizaciones, los tumores se fragmentan para minimizar la cantidad de tejido hemorrágico en cada pieza. En algunas realizaciones, los tumores se fragmentan para minimizar la cantidad de tejido necrótico en cada pieza. En algunas realizaciones, los tumores se fragmentan para minimizar la cantidad de tejido adiposo en cada pieza. En ciertas realizaciones, la etapa de fragmentación del tumor es un método *in vitro* o *ex vivo*.

[0491] En algunas realizaciones, la fragmentación del tumor se realiza para mantener la estructura interna del tumor. En algunas realizaciones, la fragmentación del tumor se lleva a cabo sin realizar previamente un movimiento de aserrado con un bisturí. En algunas realizaciones, los TIL se obtienen a partir de digestiones tumorales. En algunas realizaciones, los digeridos tumorales se generaron por incubación en medios enzimáticos, por ejemplo pero no limitados a RPMI 1640, 2 mM GlutaMAX, 10 mg/mL de gentamicina, 30 U/mL de DNasa, y 1,0 mg/mL de colagenasa, seguido de disociación mecánica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Tras colocar el tumor en un medio enzimático, se puede disociar mecánicamente durante aproximadamente 1 minuto. A continuación, se puede incubar la solución durante 30 minutos a 37 °C en un 5% de CO_2 y se vuelve a disgregar mecánicamente durante aproximadamente 1 minuto. Tras incubarlo de nuevo durante 30 minutos a 37 °C en un 5% de CO_2, el tumor puede disgregarse mecánicamente por tercera vez durante aproximadamente 1 minuto. En algunas realizaciones, después de la tercera disociación mecánica, si había trozos grandes de tejido, se aplicaron 1 ó 2 disociaciones mecánicas adicionales a la muestra, con o sin 30 minutos adicionales de incubación a 37 °C en 5% de CO_2. En algunas realizaciones, al final de la incubación final, si la suspensión celular

contiene un gran número de glóbulos rojos o células muertas, se puede realizar una separación en gradiente de densidad utilizando Ficoll para eliminar estas células.

[0492] En algunas realizaciones, la suspensión celular previa al primera etapa de expansión se denomina "población celular primaria" o población celular "recién obtenida" o "recién aislada".

[0493] En algunas realizaciones, las células pueden ser opcionalmente congeladas después del aislamiento de la muestra (por ejemplo, después de obtener la muestra tumoral y/o después de obtener la suspensión celular de la muestra tumoral) y almacenadas congeladas antes de entrar en la expansión descrita en la Etapa B, que se describe con más detalle a continuación, así como se ejemplifica en la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B).

1. TILS derivados de biopsia con aguja gruesa/pequeña

[0494] En algunas realizaciones, los TIL se obtienen inicialmente de una muestra de tumor de paciente ("TILs primarios") obtenidos por una biopsia de núcleo o procedimiento similar y luego se expanden en una población más grande para manipulación adicional como se describe aquí, opcionalmente criopreservados, y opcionalmente evaluados para fenotipo y parámetros metabólicos.

[0495] En algunas realizaciones, una muestra de tumor de paciente puede ser obtenida usando métodos conocidos en el arte, generalmente vía biopsia pequeña, biopsia de núcleo, biopsia de aguja u otros medios para obtener una muestra que contiene una mezcla de tumor y células TIL. En general, la muestra tumoral puede proceder de cualquier tumor sólido, incluidos tumores primarios, tumores invasivos o tumores metastásicos. La muestra tumoral también puede ser un tumor líquido, como un tumor obtenido de una neoplasia hematológica. En algunas realizaciones, la muestra puede proceder de múltiples muestras tumorales pequeñas o biopsias. En algunas realizaciones, la muestra puede comprender múltiples muestras tumorales de un único tumor del mismo paciente. En algunas realizaciones, la muestra puede comprender múltiples muestras tumorales de uno, dos, tres o cuatro tumores del mismo paciente. En algunas realizaciones, la muestra puede comprender múltiples muestras tumorales de múltiples tumores del mismo paciente. El tumor sólido puede ser de pulmón y/o cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

[0496] En general, la suspensión celular obtenida del núcleo o fragmento tumoral se denomina "población celular primaria" o población celular "recién obtenida" o "recién aislada". En ciertas realizaciones, la población celular de TILs recién obtenida se expone a un medio de cultura celular que comprende células presentadoras de antígeno, IL-2 y OKT-3.

[0497] En algunas realizaciones, si el tumor es metastásico y la lesión primaria ha sido eficientemente tratada/extirpada en el pasado, la extirpación de una de las lesiones metastásicas puede ser necesaria. En algunas realizaciones, el abordaje menos invasivo consiste en extirpar una lesión cutánea o un ganglio linfático del cuello o de la zona axilar, si está disponible. En algunas realizaciones, se extirpa una lesión cutánea o se extrae una pequeña biopsia de la misma. En algunas realizaciones, se extrae un ganglio linfático o una pequeña biopsia del mismo. En algunas realizaciones, se puede emplear una lesión metastásica pulmonar o hepática, o un ganglio linfático intraabdominal o torácico o una pequeña biopsia del mismo.

[0498] El tumor puede ser un melanoma. La pequeña biopsia para un melanoma puede comprender un lunar o una porción del mismo.

[0499] La biopsia pequeña puede ser una biopsia en sacabocados. La biopsia en sacabocados puede obtenerse con una cuchilla circular que se presiona contra la piel. La biopsia en sacabocados puede obtenerse con una cuchilla circular que se presiona en la piel alrededor de un lunar sospechoso. La biopsia en sacabocados puede obtenerse presionando la piel con una cuchilla circular y extrayendo un trozo redondo de piel. La biopsia pequeña puede ser una biopsia en sacabocados y se extrae una porción redonda del tumor.

[0500] La biopsia pequeña puede ser una biopsia por escisión. La biopsia pequeña puede ser una biopsia por escisión y se extirpa todo el lunar o crecimiento. La biopsia pequeña puede ser una biopsia por escisión y se extirpa todo el lunar o crecimiento junto con un pequeño borde de piel de apariencia normal.

[0501] La pequeña biopsia puede ser una biopsia incisional. La biopsia pequeña puede ser una biopsia incisional y sólo se toma la parte más irregular de un lunar o crecimiento. La biopsia pequeña puede ser una biopsia incisional y la biopsia incisional se utiliza cuando no se pueden completar otras técnicas, como por ejemplo si un lunar sospechoso es muy grande.

[0502] En algunas realizaciones, la biopsia pequeña es una biopsia de pulmón. En algunas realizaciones, la pequeña biopsia se obtiene mediante broncoscopia. Por lo general, en la broncoscopia se anestesia al paciente y se introduce un pequeño instrumento por la nariz o la boca, se baja por la garganta y se llega a los bronquios, donde se utilizan pequeñas herramientas para extraer parte del tejido. En algunos casos, cuando no se puede acceder al tumor o crecimiento mediante broncoscopia, se puede emplear una biopsia transtorácica con aguja. Generalmente, para una biopsia transtorácica con aguja, el paciente también está anestesiado y se introduce una aguja a través de la piel directamente en el punto sospechoso para extraer una pequeña muestra de tejido. En algunas realizaciones, una biopsia transtorácica con aguja

puede requerir radiología intervencionista (por ejemplo, el uso de rayos X o tomografía computarizada para guiar la aguja). En algunas realizaciones, la biopsia pequeña se obtiene mediante biopsia con aguja. En algunas realizaciones, la pequeña biopsia se obtiene por ultrasonido endoscópico (por ejemplo, un endoscopio con una luz y se coloca a través de la boca hasta el esófago). En algunas realizaciones, la pequeña biopsia se obtiene quirúrgicamente.

[0503] La biopsia pequeña puede ser una biopsia de cabeza y cuello. La biopsia pequeña puede ser una biopsia incisional. La pequeña biopsia puede ser una biopsia incisional, en la que se corta un pequeño trozo de tejido de una zona de aspecto anormal. Si se puede acceder fácilmente a la región anormal, la muestra puede tomarse sin hospitalización. Si el tumor se encuentra a mayor profundidad dentro de la boca o la garganta, puede ser necesario realizar la biopsia en un quirófano, con anestesia general. La biopsia pequeña puede ser una biopsia por escisión. La biopsia pequeña puede ser una biopsia por escisión, en la que se extirpa toda la zona. La pequeña biopsia puede ser una aspiración con aguja fina (FNA). La pequeña biopsia puede ser una aspiración con aguja fina (FNA), en la que se utiliza una aguja muy fina unida a una jeringa para extraer (aspirar) células de un tumor o bulto. La biopsia pequeña puede ser una biopsia en sacabocados. La pequeña biopsia puede ser una biopsia en sacabocados, en la que se utilizan pinzas de sacabocados para extraer un trozo de la zona sospechosa.

[0504] La biopsia pequeña puede ser una biopsia cervical. La pequeña biopsia puede obtenerse mediante colposcopia. Por lo general, los métodos de colposcopia emplean un instrumento de aumento iluminado acoplado a unos prismáticos de aumento (un colposcopio) que se utiliza para biopsiar una pequeña sección de la superficie del cuello uterino. La biopsia pequeña puede ser una biopsia de conización/cono. La biopsia pequeña puede ser una biopsia de conización/cono, en la que puede ser necesaria una intervención quirúrgica ambulatoria para extraer un trozo más grande de tejido del cuello uterino. La biopsia de cono, además de ayudar a confirmar un diagnóstico, puede servir como tratamiento inicial.

[0505] El término "tumor sólido" se refiere a una masa anormal de tejido que normalmente no contiene quistes ni áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. El término "cáncer de tumor sólido" se refiere a tumores sólidos malignos, neoplásicos, o cancerosos. Los cánceres de tumores sólidos incluyen los cánceres de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). La estructura tisular de los tumores sólidos incluye compartimentos tisulares interdependientes que incluyen el parénquima (células cancerosas) y las células estromales de soporte en las que se dispersan las células cancerosas y que pueden proporcionar un microambiente de soporte.

[0506] En algunas realizaciones, la muestra del tumor se obtiene como un aspirado con aguja fina (FNA), una biopsia central, una biopsia pequeña (incluyendo, por ejemplo, una biopsia en sacabocados). En algunas realizaciones, la muestra se coloca primero en un G-Rex 10. En algunas realizaciones, la muestra se coloca primero en un G-Rex 10 cuando hay 1 o 2 muestras de biopsia de núcleo y/o biopsia pequeña. En algunas realizaciones, la muestra se coloca primero en un G-Rex 100 cuando hay 3, 4, 5, 6, 8, 9, o 10 o más muestras de biopsia de núcleo y/o biopsia pequeña. En algunas realizaciones, la muestra se coloca primero en un G-Rex 500 cuando hay 3, 4, 5, 6, 8, 9, o 10 o más muestras de biopsia de núcleo y/o biopsia pequeña.

[0507] El FNA puede obtenerse de un tumor pulmonar, incluyendo, por ejemplo, un NSCLC. En algunas realizaciones, el FNA se obtiene de un tumor pulmonar, como un tumor pulmonar de un paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En algunos casos, el paciente con NSCLC se ha sometido previamente a un tratamiento quirúrgico.

[0508] Los TIL aquí descritos pueden obtenerse a partir de una muestra de FNA. En algunos casos, la muestra de FNA se obtiene o aísla del paciente utilizando una aguja de calibre fino que va desde una aguja de calibre 18 hasta una aguja de calibre 25. La aguja de calibre fino puede ser de calibre 18, calibre 19, calibre 20, calibre 21, calibre 22, calibre 23, calibre 24, o calibre 25. En algunas realizaciones, la muestra de FNA del paciente puede contener al menos 400.000 TILs, *por ejemplo,* 400.000 TILs, 450.000 TILs, 500.000 TILs, 550.000 TILs, 600.000 TILs, 650.000 TILs, 700.000 TILs, 750.000 TILs, 800.000 TILs, 850.000 TILs, 900.000 TILs, 950.000 TILs, o más.

[0509] En algunos casos, los TIL descritos en el presente documento se obtienen a partir de una muestra de biopsia central. En algunos casos, la muestra de la biopsia central se obtiene o aísla del paciente utilizando una aguja quirúrgica o médica que puede ser desde una aguja de calibre 11 hasta una aguja de calibre 16. La aguja puede ser de calibre 11, 12, 13, 14, 15, o 16. En algunas realizaciones, la muestra de biopsia central del paciente puede contener al menos 400.000 TILs, *por ejemplo,* 400.000 TILs, 450.000 TILs, 500.000 TILs, 550.000 TILs, 600.000 TILs, 650.000 TILs, 700.000 TILs, 750.000 TILs, 800.000 TILs, 850.000 TILs, 900.000 TILs, 950.000 TILs, o más.

[0510] En general, la suspensión celular recolecciónda se denomina "población celular primaria" o población celular "recién recolecciónda".

[0511] En algunas realizaciones, los TIL no se obtienen a partir de digestiones tumorales. En algunas realizaciones, los núcleos tumorales sólidos no están fragmentados.

[0512] Los TIL pueden obtenerse a partir de digestiones tumorales. Los digeridos tumorales pueden haberse generado por incubación en medios enzimáticos, por ejemplo pero no limitados a RPMI 1640, 2mM GlutaMAX, 10 mg/mL de

gentamicina, 30 U/mL de DNasa y 1,0 mg/mL de colagenasa, seguido de disociación mecánica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Tras colocar el tumor en un medio enzimático, se puede disociar mecánicamente durante aproximadamente 1 minuto. A continuación, se puede incubar la solución durante 30 minutos a 37 °C en un 5% de CO_2 y se vuelve a disgregar mecánicamente durante aproximadamente 1 minuto. Tras incubarlo de nuevo durante 30 minutos a 37 °C en un 5% de CO_2, el tumor puede disgregarse mecánicamente por tercera vez durante aproximadamente 1 minuto. En algunas realizaciones, después de la tercera disociación mecánica, si había trozos grandes de tejido, se aplicaron 1 ó 2 disociaciones mecánicas adicionales a la muestra, con o sin 30 minutos adicionales de incubación a 37 °C en 5% de CO_2. En algunas realizaciones, al final de la incubación final, si la suspensión celular contiene un gran número de glóbulos rojos o células muertas, se puede realizar una separación en gradiente de densidad utilizando Ficoll para eliminar estas células.

2. Métodos de expansión de linfocitos de sangre periférica (PBL) a partir de sangre periférica

[0513] Método PBL 1. Los PBL pueden ampliarse utilizando los procesos aquí descritos. El método puede comprender la obtención de una muestra de PBMC a partir de sangre total. El método puede comprender el enriquecimiento de células T mediante el aislamiento de células T puras a partir de PBMC utilizando la selección negativa de una fracción no-CD19+. El método puede comprender el enriquecimiento de células T mediante el aislamiento de células T puras a partir de PBMC utilizando selección negativa basada en microesferas magnéticas de una fracción no CD19+.

[0514] El método PBL 1 puede realizarse como sigue: El día 0, se descongela una muestra de PBMC criopreservada y se cuentan las PBMC. Las células T se aíslan utilizando un kit de aislamiento de células T Pan humanas y columnas LS (Miltenyi Biotec).

[0515] Método PBL 2. Los PBL pueden expandirse utilizando el método PBL 2, que consiste en obtener una muestra de PBMC a partir de sangre total. Las células T de las PBMC se enriquecen incubando las PBMC durante al menos tres horas a 37°C y aislando después las células no adherentes.

[0516] El método PBL 2 puede realizarse como sigue: El día 0, se descongela la muestra de PMBC criopreservada y se siembran las células PBMC a razón de 6 millones de células por pocillo en una placa de 6 pocillos en medio CM-2 y se incuban durante 3 horas a 37 grados Celsius. Al cabo de 3 horas, se extraen y se cuentan las células no adherentes, que son los PBL.

[0517] Método PBL 3. Los PBL pueden expandirse utilizando el Método 3 de PBL, que comprende la obtención de una muestra de PBMC a partir de sangre periférica. Las células B se aíslan utilizando una selección CD19+ y las células T se seleccionan utilizando una selección negativa de la fracción no CD19+ de la muestra de PBMC.

[0518] El método 3 de PBL puede realizarse como sigue: El día 0, se descongelan y se cuentan las PBMC criopreservadas derivadas de sangre periférica. Las células B CD19+ se clasifican utilizando un kit CD19 Multisort Kit, Human (Miltenyi Biotec). De la fracción de células no CD19+, las células T se purifican utilizando el Human Pan T-cell Isolation Kit and LS Columns (Miltenyi Biotec).

[0519] Las PBMC pueden aislarse de una muestra de sangre total. La muestra de PBMC puede utilizarse como material de partida para expandir los PBL. La muestra puede criopreservarse antes del proceso de expansión. Se puede utilizar una muestra fresca como material de partida para ampliar los PBL. Las células T pueden aislarse a partir de PBMC utilizando métodos conocidos en la técnica. Las células T pueden aislarse utilizando un kit de aislamiento de células T Pan humanas y columnas LS. Las células T pueden aislarse a partir de PBMC utilizando métodos de selección de anticuerpos conocidos en la técnica, por ejemplo, la selección negativa de CD19.

[0520] La muestra de PBMC puede incubarse durante un periodo de tiempo a una temperatura deseada eficaz para identificar las células no adherentes. El tiempo de incubación puede ser de unas 3 horas La temperatura puede ser de unos 37° Celsius. A continuación, las células no adherentes se expanden mediante el proceso descrito anteriormente.

[0521] La muestra de PBMC puede ser de un sujeto o paciente que ha sido opcionalmente pretratado con un régimen que comprende un inhibidor de la quinasa o un inhibidor de ITK. La muestra tumoral puede proceder de un sujeto o paciente que haya sido pretratado con un régimen que comprenda un inhibidor de la quinasa o un inhibidor de ITK. La muestra de PBMC puede proceder de un sujeto o paciente que haya sido pretratado con un régimen que comprenda un inhibidor de la quinasa o un inhibidor de ITK, haya sido sometido a tratamiento durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, o 1 año o más. Las PBMC pueden proceder de un paciente que esté en tratamiento con un inhibidor de ITK, como ibrutinib.

[0522] La muestra de PBMC puede proceder de un sujeto o paciente que ha sido pretratado con un régimen que comprende un inhibidor de la cinasa o un inhibidor de ITK y es refractario al tratamiento con un inhibidor de la cinasa o un inhibidor de ITK, como ibrutinib.

[0523] La muestra de PBMC puede ser de un sujeto o paciente que ha sido pre-tratado con un régimen que comprende un inhibidor de quinasa o un inhibidor de ITK pero que ya no está bajo tratamiento con un inhibidor de quinasa o un

inhibidor de ITK. La muestra de PBMC puede proceder de un sujeto o paciente que haya sido pretratado con un régimen que comprenda un inhibidor de la quinasa o un inhibidor de ITK, pero que ya no esté en tratamiento con un inhibidor de la quinasa o un inhibidor de ITK y que no haya estado en tratamiento durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, o al menos 1 año o más. Las PBMC pueden proceder de un paciente que haya estado previamente expuesto a un inhibidor de ITK, pero que no haya sido tratado en al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 9 meses o al menos 1 año.

[0524] En el Día 0, las células pueden ser seleccionadas para CD19+ y clasificadas en consecuencia. La selección puede realizarse utilizando perlas de unión de anticuerpos. Las células T puras pueden aislarse el Día 0 a partir de las PBMC.

[0525] Para pacientes que no son pre-tratados con ibrutinib u otro inhibidor de ITK, 10-15ml de Buffy Coat pueden producir alrededor de 5×10^9 PBMC, que, a su vez, producirán alrededor de $5{,}5\times10^7$ PBLs.

[0526] Para pacientes pretratados con ibrutinib u otro inhibidor de ITK, el proceso de expansión puede producir alrededor de 20×10^9 PBLs. En una realización de la invención, $40{,}3\times10^6$ PBMC producirán aproximadamente $4{,}7\times10^5$ PBL.

[0527] Las PBMCs pueden derivarse de una muestra de sangre entera, por aféresis, de la capa leucocitaria, o de cualquier otro método conocido e la técnica para obtener PBMCs.

3. Métodos de expansión de linfocitos infiltrantes de médula ósea (MIL) a partir de PBMC derivadas de médula ósea

[0528] Método MIL 3. El método puede comprender la obtención de PBMC de la médula ósea. El Día 0, las PBMC se seleccionan para CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ y se clasifican, y la fracción de células que no son CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ se sonican y una parte de la fracción de células sonicadas se añade de nuevo a la fracción de células seleccionadas.

[0529] Método MIL 3 puede realizarse como sigue: El día 0, se descongela una muestra crioconservada de PBMC y se cuentan las PBMC. Las células se tiñen con anticuerpos CD3, CD33, CD20, y CD14 y se clasifican utilizando un clasificador celular S3e (Bio-Rad). Las células se clasifican en dos fracciones: una fracción de células inmunitarias (o fracción MIL) (CD3+CD33+CD20+CD14+) y una fracción de células blásticas de AML (no CD3+CD33+CD20+CD14+).

[0530] Las PBMC pueden obtenerse de la médula ósea. Las PBMC pueden obtenerse de la médula ósea mediante aféresis, aspiración, biopsia con aguja, u otros medios similares conocidos en la técnica. Las PBMC pueden ser frescas. Las PBMC pueden criopreservarse.

[0531] Los MIL pueden expandirse a partir de 10-50 ml de aspirado de médula ósea. Se pueden obtener 10 ml de aspirado de médula ósea del paciente. Se pueden obtener 20 ml de aspirado de médula ósea del paciente. Se pueden obtener 30 ml de aspirado de médula ósea del paciente. Se pueden obtener 40 ml de aspirado de médula ósea del paciente. Se pueden obtener 50 ml de aspirado de médula ósea del paciente.

[0532] El número de PBMCs obtenidas de 10-50ml de aspirado de médula ósea puede ser de 5×10^7 a 10×10^7 PBMCs. El número de PMBCs producidas puede ser de aproximadamente 7×10^7 PBMCs.

[0533] Aproximadamente 5×10^7 a aproximadamente 10×10^7 PBMCs, pueden producir aproximadamente $0{,}5\times10^6$ a aproximadamente $1{,}5\times10^6$ MILs. Se pueden producir alrededor de 1×10^6 MILs.

[0534] 12×10^6 PBMC derivadas de aspirado de médula ósea pueden producir aproximadamente $1{,}4\times10^5$ MILs.

[0535] Las PBMCs pueden derivarse de una muestra de sangre entera, de médula ósea, por aféresis, de la capa leucocitaria, o de cualquier otro método conocido en la técnica para obtener PBMCs.

B. ETAPA B: Cebado Primera expansión

[0536] En algunas realizaciones, los métodos presentes proporcionan TILs más jóvenes, que pueden proporcionar beneficios terapéuticos adicionales sobre TILs más viejos (*es decir,* TILs que han sufrido más rondas de replicación antes de la administración a un sujeto/paciente). Las características de los TIL jóvenes se han descrito en la literatura, por ejemplo Donia, at 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.,; Shen et al., J Immunother, 30:123-129 (2007); Zhou, et al., J Immunother, 28:53-62 (2005); y Tran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008).

[0537] Después de la disección o digestión de fragmentos tumorales y/o fragmentos tumorales, por ejemplo como se describe en la Etapa A de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 8C), las células resultantes se cultivan en suero que contiene IL-2, OKT-3, y células alimentadoras (*por ejemplo,* células alimentadoras presentadoras de antígeno), bajo condiciones que favorecen el crecimiento de TILs sobre células tumorales y otras células. En algunas realizaciones, la IL-2, OKT-3, y las células alimentadoras se añaden al inicio del cultivo junto con el digerido tumoral y/o

los fragmentos tumorales (por ejemplo, en el Día 0). En algunas realizaciones, los digeridos tumorales y/o fragmentos tumorales se incuban en un recipiente con hasta 60 fragmentos por recipiente y con 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, esta población de células primarias se cultiva durante un periodo de días, generalmente de 1 a 8 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente alrededor de 1 × 10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, esta población de células primarias se cultiva durante un periodo de días, generalmente de 1 a 7 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente alrededor de 1 × 10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado se produce durante un periodo de 1 a 8 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente de aproximadamente 1 × 10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado se produce durante un periodo de 1 a 7 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente de aproximadamente 1 × 10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, esta primera expansión de cebado se produce durante un periodo de 5 a 8 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente de aproximadamente 1 × 10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, esta primera expansión de cebado se produce durante un periodo de 5 a 7 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente de aproximadamente 1 × 10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, esta primera expansión de cebado se produce durante un periodo de aproximadamente 6 a 8 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente de aproximadamente 1 × 10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, esta primera expansión de cebado se produce durante un periodo de aproximadamente 6 a 7 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente de aproximadamente 1 × 10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, esta primera expansión de cebado se produce durante un periodo de aproximadamente 7 a 8 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente de aproximadamente 1 × 10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, esta primera expansión de cebado se produce durante un periodo de aproximadamente 7 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente de aproximadamente 1 × 10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, esta primera expansión de cebado se produce durante un periodo de aproximadamente 8 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente de aproximadamente 1 × 10^8 células TIL masivas.

[0538] En una realización preferida, la expansión de TILs puede realizarse utilizando una primera etapa de expansión de cebado (por ejemplo, como los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, p. ej., Figura 8B y/o Figura 8C), que puede incluir procesos denominados pre-REP o REP de cebado y que contiene células alimentadoras desde el Día 0 y/o desde el inicio del cultivo) como se describe a continuación y en el presente documento, seguido de una segunda expansión rápida (Etapa D, que incluye procesos denominados etapas de protocolo de expansión rápida (REP)) como se describe a continuación en la Etapa D y en el presente documento, seguido de criopreservación opcional, y seguido de una segunda Etaopa D (que incluye procesos denominados etapas de REP de reestimulación) como se describe a continuación y en el presente documento. Los TIL obtenidos de este proceso pueden caracterizarse opcionalmente para características fenotípicas y parámetros metabólicos como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene entre 1 mm^3 y 10 mm^3 aproximadamente.

[0539] En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión se denomina "CM", una abreviatura de medio de cultivo. En algunas realizaciones, el CM para la Etapa B consiste en RPMI 1640 con GlutaMAX, suplementado con 10% de suero AB humano, 25 mM de Hepes, y 10 mg/mL de gentamicina.

[0540] En algunas realizaciones, hay menos o igual a 240 fragmentos tumorales. En algunas realizaciones, hay menos de o igual a 240 fragmentos tumorales colocados en menos de o igual a 4 contenedores. En algunas realizaciones, los recipientes son matraces GREX100 MCS. En algunas realizaciones, se colocan menos o igual a 60 fragmentos tumorales en 1 contenedor. En algunas realizaciones, cada envase contiene menos o igual a 500 ml de medio por envase. En algunas realizaciones, el medio comprende IL-2. En algunas realizaciones, el medio comprende 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el medio comprende células alimentadoras presentadoras de antígeno (también denominadas en el presente documento "células presentadoras de antígeno"). En algunas realizaciones, el medio comprende 2,5 ×10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno por envase. Los medios comprenden OKT-3. En algunas realizaciones, el medio comprende 30 ng/mL de OKT-3 por envase. En algunas realizaciones, el recipiente es un matraz GREX100 MCS. En algunas realizaciones, el medio comprende 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng de OKT-3 y 2,5 ×10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, el medio comprende 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3 y 2,5 ×10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno por envase.

[0541] Después de la preparación de los fragmentos tumorales, las células resultantes (*es decir, los* fragmentos que es una población celular primaria) se cultivan en medios que contienen IL-2, células alimentadoras presentadoras de antígeno y OKT-3 en condiciones que favorecen el crecimiento de TIL sobre el tumor y otras células y que permiten el cebado de TIL y el crecimiento acelerado desde el inicio del cultivo en el Día 0. En algunas realizaciones, los digeridos tumorales y/o fragmentos tumorales se incuban en con 6000 UI/mL de IL-2, así como células alimentadoras presentadoras de antígeno y OKT-3. Esta población celular primaria se cultiva durante un periodo de días, generalmente de 1 a 8 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente alrededor de 1×10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, el medio de crecimiento durante la primera expansión de cebado comprende IL-2 o una variante de la misma, así como células alimentadoras presentadoras de antígeno y OKT-3. En algunas realizaciones, esta población celular primaria se cultiva durante un periodo de días, generalmente de 1 a 7 días, dando lugar a una población TIL masiva, generalmente alrededor de 1×10^8 células TIL masivas. En algunas realizaciones, el medio de crecimiento durante la primera expansión de cebado comprende IL-2 o una variante de la misma, así como células alimentadoras presentadoras de antígeno y OKT-3. En algunas realizaciones, la IL-2 es IL-2 humana recombinante (rhIL-2). En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 20-30×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la

solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 20×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 25×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 30×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL- 2 tiene una concentración final de $4\text{-}8\times10^6$ UI/mg de IL-2. En algunas realizaciones, la solución madre de IL- 2 tiene una concentración final de $5\text{-}7\times10^6$ UI/mg de IL-2. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una concentración final de 6×10^6 UI/mg de IL-2. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 se prepara como se describe en el Ejemplo C. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende alrededor de 10.000 UI/mL de IL-2, alrededor de 9.000 UI/mL de IL-2, alrededor de 8.000 UI/mL de IL-2, alrededor de 7.000 UI/mL de IL-2, alrededor de 6.000 UI/mL de IL-2, o alrededor de 5.000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de cebado de primera expansión comprende de aproximadamente 9.000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 5.000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de cebado de primera expansión comprende de aproximadamente 8.000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 6.000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de cebado de primera expansión comprende de aproximadamente 7.000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 6.000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 6.000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende además IL-2. En una realización preferida, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 1000 UI/mL, aproximadamente 1500 UI/mL, aproximadamente 2000 UI/mL, aproximadamente 2500 UI/mL, aproximadamente 3000 UI/mL, aproximadamente 3500 UI/mL, aproximadamente 4000 UI/mL, aproximadamente 4500 UI/mL, aproximadamente 5000 UI/mL, aproximadamente 5500 UI/mL, aproximadamente 6000 UI/mL, aproximadamente 6500 UI/mL, aproximadamente 7000 UI/mL, aproximadamente 7500 UI/mL, o aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo de células de primera expansión de cebado comprende entre 1000 y 2000 UI/mL, entre 2000 y 3000 UI/mL, entre 3000 y 4000 UI/mL, entre 4000 y 5000 UI/mL, entre 5000 y 6000 UI/mL, entre 6000 y 7000 UI/mL, entre 7000 y 8000 UI/mL, o alrededor de 8000 UI/mL de IL-2.

[0542] En algunas realizaciones, los medios de cultivo de primera expansión de cebado comprenden aproximadamente 500 UI/mL de IL-15, aproximadamente 400 UI/mL de IL-15, aproximadamente 300 UI/mL de IL-15, aproximadamente 200 UI/mL de IL-15, aproximadamente 180 UI/mL de IL-15, aproximadamente 160 UI/mL de IL-15, aproximadamente 140 UI/mL de IL-15, aproximadamente 120 UI/mL de IL-15, o aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 500 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende de aproximadamente 400 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende de aproximadamente 300 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de cebado de primera expansión comprende aproximadamente 200 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15. En una realización, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende además IL-15. En una realización preferida, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15.

[0543] En algunas realizaciones, los medios de cultivo de cebado de primera expansión comprenden aproximadamente 20 UI/mL de IL-21, aproximadamente 15 UI/mL de IL-21, aproximadamente 12 UI/mL de IL-21, aproximadamente 10 UI/mL de IL-21, aproximadamente 5 UI/mL de IL-21, aproximadamente 4 UI/mL de IL-21, aproximadamente 3 UI/mL de IL-21, aproximadamente 2 UI/mL de IL-21, aproximadamente 1 UI/mL de IL-21, o aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende de aproximadamente 20 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende entre aproximadamente 15 UI/mL de IL-21 y aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende de aproximadamente 12 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende entre aproximadamente 10 UI/mL de IL-21 y aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende de aproximadamente 5 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 2 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-21. En una realización preferida, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21.

[0544] El medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende el anticuerpo OKT-3. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 30 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende aproximadamente 0,1 ng/ml, aproximadamente 0,5 ng/ml, aproximadamente 1 ng/ml, aproximadamente 2,5 ng/ml, aproximadamente 5 ng/ml, aproximadamente 7,5 ng/ml, aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 15 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 25 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml, aproximadamente 35 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 70 ng/ml,

aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 90 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, y aproximadamente 1 µg/ml de anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 0,1 ng/mL y 1 ng/mL, entre 1 ng/mL y 5 ng/mL, entre 5 ng/mL y 10 ng/mL, entre 10 ng/mL y 20 ng/mL, entre 20 ng/mL y 30 ng/mL, entre 30 ng/mL y 40 ng/mL, entre 40 ng/mL y 50 ng/mL, y entre 50 ng/mL y 100 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 15 ng/ml y 30 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende 30 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En algunas realizaciones, el anticuerpo OKT-3 es muromonab.

TABLA 19: Secuencias de aminoácidos de muromonab (anticuerpo OKT-3 ejemplar)

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 1: Cadena pesada de Muromonab	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG YFPESVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRG PTIKPCPPCK CPAPNLLGGP PSVFIFPPKI KDVLMISLSP IVTCVVVDVS EDDPDVQISW FVNNVEVHTA QTQTHREDYN STIRVVSVLP IQHQDWLNGK EFKCRVNSAA FPAPIEKTIS KTKGRPKAPQ VYTIPPPKEQ LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID N.º 2: Cadena ligera Muromonab	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

[0545] En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende uno o más agonistas del TNFRSF en un medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF comprende un agonista del 4-1BB. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF es un agonista 4-1BB, y el agonista 4-1BB se selecciona del grupo que consiste en urelumab, utomilumab, EU-101, una proteína de fusión, y fragmentos, derivados, variantes, biosimilares y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF se añade a una concentración suficiente para alcanzar una concentración en el medio de cultivo celular de entre 0,1 µg/mL y 100 µg/mL. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF se añade a una concentración suficiente para alcanzar una concentración en el medio de cultivo celular de entre 20 µg/mL y 40 µg/mL.

[0546] En algunas realizaciones, además de uno o más agonistas de TNFRSF, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende además IL-2 a una concentración inicial de aproximadamente 3000 UI/mL y anticuerpo OKT-3 a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/mL, y donde el uno o más agonistas de TNFRSF comprende un agonista 4-1BB. En algunas realizaciones, además de uno o más agonistas de TNFRSF, el medio de cultivo celular de primera expansión de cebado comprende además IL-2 a una concentración inicial de aproximadamente 6000 UI/mL y anticuerpo OKT-3 a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/mL, y donde el uno o más agonistas del TNFRSF comprende un agonista 4-1BB.

[0547] En algunas realizaciones, el medio de cultivo de primera expansión de cebado se denomina "CM", una abreviatura de medio de cultivo. En algunas realizaciones, se denomina CM1 (medio de cultivo 1). En algunas realizaciones, el CM consiste en RPMI 1640 con GlutaMAX, suplementado con 10% de suero AB humano, 25 mM de Hepes y 10 mg/mL de gentamicina. En algunas realizaciones, el CM es el CM1 descrito en los Ejemplos, *véase,* Ejemplo A. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado se produce en un medio de cultivo celular inicial o un primer medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de cebado de primera expansión o el medio de cultivo celular inicial o el primer medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno (también denominadas en el presente documento células alimentadoras).

[0548] En algunas realizaciones, el medio de cultivo utilizado en los procesos de expansión aquí divulgados es un medio libre de suero o un medio definido. En algunas realizaciones, el medio libre de suero o definido comprende un medio celular basal y un suplemento de suero y/o un sustituto de suero. En algunas realizaciones, el medio libre de suero o definido se utiliza para prevenir y/o disminuir la variación experimental debida en parte a la variación lote a lote de los medios que contienen suero.

[0549] En algunas realizaciones, el medio libre de suero o definido comprende un medio celular basal y un suplemento

de suero y/o un reemplazo de suero. En algunas realizaciones, el medio celular basal incluye, entre otros, CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium, CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, CTS™ AIM-V Medium, CTS™ AIM-V SFM, LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimal Essential Medium (MEM), Basal Medium Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Minimal Essential Medium (αMEM), Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM), RPMI growth medium y Iscove's Modified Dulbecco's Medium.

[0550] En algunas realizaciones, el suplemento de suero o el reemplazo de suero incluye, pero no se limita a uno o más de CTS™ OpTmizer T-Cell Expansion Serum Supplement, CTS™ Immune Cell Serum Replacement, una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más antibióticos, y uno o más oligoelementos. En algunas realizaciones, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina y compuestos que contengan oligoelementos g^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+} Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas realizaciones, el medio definido comprende además L-glutamina, bicarbonato sódico y/o 2-mercaptoetanol.

[0551] En algunas realizaciones, el Suero de Reemplazo de Células Inmunes de Células T CTS™OpTmizer™ se utiliza con medios de crecimiento convencionales, incluyendo pero no limitado a CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium, CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM, CTS™ AIM-V Medium, CST™ AIM-V SFM, LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, Dulbecco' ss Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimal Essential Medium (MEM), Basal Medium Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Minimal Essential Medium (αMEM), Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM), RPMI growth medium, y Iscove's Modified Dulbecco's Medium.

[0552] En algunas realizaciones, la concentración total de reemplazo de suero (vol%) en el medio libre de suero o definido es de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, o 20% en volumen del medio total libre de suero o definido. En algunas realizaciones, la concentración total de sustitución de suero es de aproximadamente el 3% del volumen total del medio libre de suero o medio definido. En algunas realizaciones, la concentración total de sustitución de suero es de aproximadamente el 5% del volumen total del medio libre de suero o medio definido. En algunas realizaciones, la concentración total de sustitución de suero es de aproximadamente el 10% del volumen total del medio libre de suero o medio definido.

[0553] En algunas realizaciones, el medio libre de suero o definido es CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM es una combinación de 1 L de CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium y 26 mL de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que se mezclan antes de su uso. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific). En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se suplementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55mM. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se suplementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y la concentración final de 2-mercaptoetanol en el medio es de 55μM.

[0554] En algunas realizaciones, el medio definido es CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM es una combinación de 1 L de CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium y 26 mL de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que se mezclan antes de su uso. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se suplementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55mM. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55mM de 2-mercaptoetanol y 2mM de L-glutamina. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55mM de 2-mercaptoetanol, y 2mM de L-glutamina, y comprende además de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55mM de 2-mercaptoetanol y 2mM de L-glutamina, y comprende además aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55mM de 2-mercaptoetanol y 2mM de L-glutamina, y comprende además aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y 55mM de 2-mercaptoetanol, y comprende además entre aproximadamente 1000 UI/mL y aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y 55mM de 2-mercaptoetanol, y comprende además aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y 55mM de 2-mercaptoetanol, y comprende además de aproximadamente

1000 UI/mL a aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2mM de glutamina, y comprende además entre aproximadamente 1000 UI/mL y aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™™ T-cell Expansion SFM se suplementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2mM de glutamina, y comprende además aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2mM de glutamina, y comprende además aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se suplementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y la concentración final de 2-mercaptoetanol en el medio es de 55µM.

[0555] En algunas realizaciones, el medio libre de suero o medio definido se suplementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 0,1mM a aproximadamente 10mM, 0,5mM a aproximadamente 9mM, 1mM a aproximadamente 8mM, 2mM a aproximadamente 7mM, 3mM a aproximadamente 6mM, o 4mM a aproximadamente 5 mM. En algunas realizaciones, el medio libre de suero o medio definido se suplementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 2mM.

[0556] En algunas realizaciones, el medio libre de suero o medio definido es suplementado con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, 10 mM a aproximadamente 140 mM, 15 mM a aproximadamente 130 mM, 20 mM a aproximadamente 120 mM, 25 mM a aproximadamente 110 mM, 30 mM a aproximadamente 100 mM, 35 mM a aproximadamente 95 mM, 40 mM a aproximadamente 90 mM, 45 mM a aproximadamente 85 mM, 50 mM a aproximadamente 80 mM, 55 mM a aproximadamente 75 mM, 60 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 65 mM. En algunas realizaciones, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 55mM. En algunas realizaciones, la concentración final de 2-mercaptoetanol en el medio es de 55µM.

[0557] En algunas realizaciones, los medios definidos descritos en la Publicación Internacional PCT N.º WO/1998/030679 son útiles en la presente invención. En esa publicación se describen medios de cultivo de células eucariotas sin suero. El medio de cultivo de células eucariotas sin suero incluye un medio de cultivo celular basal suplementado con un suplemento sin suero capaz de soportar el crecimiento de células en cultivo sin suero. El suplemento de medio de cultivo de células eucariotas sin suero comprende o se obtiene combinando uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más oligoelementos, y uno o más antibióticos. En algunas realizaciones, el medio definido comprende además L-glutamina, bicarbonato sódico y/o beta-mercaptoetanol. En algunas realizaciones, el medio definido comprende una albúmina o un sustituto de albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, y uno o más oligoelementos. En algunas realizaciones, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contengan oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas realizaciones, el medio celular basal se selecciona del grupo que consiste en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), Medio Esencial Mínimo (MEM), Medio Basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), medio de crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado de Iscove.

[0558] En algunas realizaciones, la concentración de glicina en el medio definido está en el rango de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-histidina es de aproximadamente 5-250 mg/L, la concentración de L-isoleucina es de aproximadamente 5-300 mg/L, la concentración de L-metionina es de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-fenilalanina es de unos 5-400 mg/L, la concentración de L-prolina es de unos 1-1000 mg/L, la concentración de L-hidroxiprolina es de unos 1-45 mg/L, la concentración de L-serina es de unos 1-250 mg/L, la concentración de L-treonina es de unos 10-500 mg/L, la concentración de L-triptófano es de unos 2-110 mg/L, la concentración de L-tirosina es de unos 3-175 mg/L, la concentración de L-valina es de unos 5-500 mg/L, la concentración de tiamina es de unos 1-20 mg/L, la concentración de glutatión reducido es de unos 1-20 mg/L, la concentración de ácido L-ascórbico-2-fosfato es de aproximadamente 1-200 mg/L, la concentración de transferrina saturada de hierro es de aproximadamente 1-50 mg/L, la concentración de insulina es de aproximadamente 1-100 mg/L, la concentración de selenito sódico es de aproximadamente 0,000001-0,0001 mg/L, y la concentración de albúmina (p. ej, AlbuMAX® I) es de unos 5000-50.000 mg/L.

[0559] En algunas realizaciones, los ingredientes de moléculas de elementos no traza en el medio definido están presentes en los rangos de concentración enumerados en la columna bajo el título "Intervalo de Concentración en Medio 1X" en la Tabla A a continuación. En otras realizaciones, los ingredientes de la fracción no oligoelemento en el medio definido están presentes en las concentraciones finales enumeradas en la columna bajo el título "Una realización preferida del medio 1X" en la Tabla A a continuación. En otras realizaciones, el medio definido es un medio celular basal que comprende un

suplemento libre de suero. En algunas de estas realizaciones, el suplemento libre de suero comprende ingredientes no traza del tipo y en las concentraciones enumeradas en la columna bajo el título "Una Realización Preferida en Suplemento" en la Tabla A a continuación.

Tabla A: Concentraciones de ingredientes que no son elementos traza

Ingrediente	Una realización preferida en suplemento (mg/L) (Aproximadamente)	Intervalo de concentración en medio 1X (mg/L) (Aproximadamente)	Una realización preferida en medio 1X (mg/L) (Aproximadamente)
Glicina	150	5-200	53
L-histidina	940	5-250	183
L-Isoleucina	3400	5-300	615
L-metionina	90	5-200	44
L-Fenilalanina	1800	5-400	336
L-Prolina	4000	1-1000	600
L-hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-treonina	2200	10-500	425
L-triptófano	440	2-110	82
L-Tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454
Tiamina	33	1-20	9
Glutatión reducido	10	1-20	1,5
Ácido ascórbico-2-PO_4 (sal de Mg)	330	1-200	50
Transferrina (saturada de hierro)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10
Selenito sódico	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83.000	5000-50.000	12.500

[0560] En algunas realizaciones, la osmolaridad del medio definido está entre aproximadamente 260 y 350 mOsmol. En algunas realizaciones, la osmolaridad está entre 280 y 310 mOsmol. En algunas realizaciones, el medio definido se complementa con hasta aproximadamente 3,7 g/L, o aproximadamente 2,2 g/L de bicarbonato de sodio. El medio definido puede suplementarse además con L-glutamina (concentración final de aproximadamente 2 mM), uno o más antibióticos, aminoácidos no esenciales (NEAA; concentración final de aproximadamente 100 µM), 2-mercaptoetanol (concentración final de aproximadamente 100 µM).

[0561] En algunas realizaciones, los medios definidos descritos en Smith, et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement," Clin Transl Immunology, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) son útiles en la presente invención. Brevemente, se utilizó RPMI o CTS™ OpTmizer™ como medio celular basal, y se suplementó con 0, 2%, 5% o 10% de CTS™ Immune Cell Serum Replacement.

[0562] En una realización, el medio celular en el primer y/o segundo contenedor permeable al gas no está filtrado. El uso de un medio celular no filtrado puede simplificar los procedimientos necesarios para ampliar el número de células. En una realización, el medio celular en el primer y/o segundo contenedor permeable al gas carece de beta-mercaptoetanol (BME o βME; también conocido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

[0563] En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (incluyendo procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 1B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los que a veces se denominan pre-REP o REP de cebado) es de 1 a 8 días, como se discute en los ejemplos y figuras. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (incluyendo procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 1B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 2 a 8 días. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (incluyendo procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 1B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 3 a 8 días. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (incluyendo procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP de cebado) es de 4 a 8 días, como se discute en los ejemplos y figuras. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (incluyendo procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP de cebado) es de 1 a 7 días, como se discute en los ejemplos y figuras. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (incluyendo procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 1B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 2 a 8 días. En

algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (que incluye procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 2 a 7 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (incluidos procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 3 a 8 días, En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado (incluidos procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 3 a 8 días. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (que incluye procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 4 a 8 días. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (que incluye procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 4 a 7 días. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (que incluye procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 5 a 8 días. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (que incluye procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 5 a 7 días. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (que incluye procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 6 a 8 días. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (que incluye procesos como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir los denominados a veces pre-REP o REP de cebado) es de 6 a 7 días. En algunas realizaciones, el proceso de primera expansión de cebado (incluyendo procesos como, por ejemplo, los proporcionados en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como el proceso pre-REP o REP de cebado) es de 7 a 8 días. En algunas realizaciones, el proceso de cebado de primera expansión (incluidos procesos tales como, por ejemplo, los proporcionados en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, *por ejemplo,* la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como el proceso pre-REP o cebado REP) es de 8 días. En algunas realizaciones, el proceso de cebado de primera expansión (incluidos procesos tales como, por ejemplo, los proporcionados en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como el proceso pre-REP o cebado REP) es de 7 días.

[0564] En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 1 a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 1 a 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 2 a 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 2 a 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 3 a 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 3 a 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 4 a 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 4 a 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 5 a 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 5 a 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede continuar durante 6 a 8 días desde cuando se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede continuar durante 6 a 7 días desde cuando se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede proceder durante 7 a 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede continuar durante 8 días desde cuando se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL de cebado puede continuar durante 7 días desde cuando se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado.

[0565] En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado de los TIL puede proceder durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, u 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 1 a 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 1 a 7 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 2 a 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 2 a 7 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 3 a 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 3 a 7 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 4 a 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 4 a 7 días. En algunas realizaciones,

la primera expansión de TIL puede durar de 5 a 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 5 a 7 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 6 a 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 6 a 7 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede durar de 7 a 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede continuar durante 8 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede continuar durante 7 días.

[0566] En algunas realizaciones, se emplea una combinación de IL-2, IL-7, IL-15, y/o IL-21 durante la primera expansión de cebado. En algunas realizaciones, IL-2, IL-7, IL-15, y/o IL-21 así como cualquier combinación de las mismas puede incluirse durante la primera expansión de cebado, incluyendo, por ejemplo durante los procesos de la Etapa B según la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea una combinación de IL-2, IL-15, e IL-21 durante la primera expansión de cebado. En algunas realizaciones, la IL-2, la IL-15 y la IL-21, así como cualquier combinación de las mismas, pueden incluirse durante los procesos de la Etapa B según la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C) y según se describe en el presente documento.

[0567] En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado, por ejemplo, la Etapa B según la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea un biorreactor. En algunas realizaciones, se emplea un biorreactor como contenedor. En algunas realizaciones, el biorreactor empleado es, por ejemplo, un G-REX-10 o un G-REX-100. En algunas realizaciones, el biorreactor empleado es un G-REX-100. En algunas realizaciones, el biorreactor empleado es un G-REX-10.

1. Células alimentadoras y células presentadoras de antígeno

[0568] En una realización, los procedimientos de primera expansión de cebado descritos en el presente documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, *p. ej.,* Figura 8B y/o Figura 8C), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) no requieren células alimentadoras (también denominadas en el presente documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión de cebado. En una realización, los procedimientos de cebado de primera expansión descritos en este documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) no requieren células alimentadoras (también denominadas en este documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se agregan durante la primera expansión de cebado en cualquier momento durante los días 4 a 8. En una realización, los procedimientos de cebado de primera expansión descritos en este documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) no requieren células alimentadoras (también denominadas en este documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se agregan durante la primera expansión de cebado en cualquier momento durante los días 4 a 7. En una realización, los procedimientos de cebado de primera expansión descritos en este documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) no requieren células alimentadoras (también denominadas en este documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se agregan durante la primera expansión de cebado en cualquier momento durante los días 5 a 8. En una realización, los procedimientos de cebado de primera expansión descritos en este documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, *p. ej.,* la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) no requieren células alimentadoras (también denominadas en este documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se agregan durante la primera expansión de cebado en cualquier momento durante los días 5 a 7. En una realización, los procedimientos de cebado de primera expansión descritos en este documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) no requieren células alimentadoras (también denominadas en este documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se agregan durante la primera expansión de cebado en cualquier momento durante los días 6 a 8. En una realización, los procedimientos de cebado de primera expansión descritos en este documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) no requieren células alimentadoras (también denominadas en este documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se agregan durante la primera expansión de cebado en cualquier momento durante los días 6 a 7. En una realización, los procedimientos de cebado de primera expansión descritos en este documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) no requieren células alimentadoras (también denominadas en este documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se agregan durante la primera expansión de cebado en cualquier momento durante los días 7 o 8. En una realización, los procedimientos de cebado de primera expansión descritos en este documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) no requieren células alimentadoras (también denominadas en este documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se agregan durante la primera expansión de cebado en cualquier momento durante el día 7. En una realización, los procedimientos de cebado de primera expansión descritos en este

documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, *p. ej.*, la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) no requieren células alimentadoras (también denominadas en este documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se agregan durante la primera expansión de cebado en cualquier momento durante el día 8.

[0569] En una realización, los procedimientos de primera expansión de cebado descritos en el presente documento (por ejemplo, incluyendo expansiones como las descritas en la Etapa B de la Figura 8 (en particular, *p. ej.,* la Figura 8B), así como las denominadas pre-REP o REP de cebado) requieren células alimentadoras (también denominadas en el presente documento "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL y durante la primera expansión de cebado. En muchas realizaciones, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de unidades de sangre total estándar de donantes de sangre sanos alogénicos. Las PBMC se obtienen utilizando métodos estándar como la separación en gradiente Ficoll-Paque. En algunas realizaciones, se utilizan $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras durante la primera expansión de cebado. En algunas realizaciones, se utilizan $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras por contenedor durante la primera expansión de cebado. En algunas realizaciones, se utilizan $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras por GREX-10 durante la primera expansión de cebado. En algunas realizaciones, se utilizan $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras por GREX-100 durante la primera expansión de cebado.

[0570] En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se utilizan en los procedimientos REP, como se describe en los ejemplos, que proporciona un protocolo ejemplar para evaluar la incompetencia de replicación de PBMC alogénicas irradiadas.

[0571] En algunas realizaciones, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y aceptables para su uso en los procedimientos de expansión de TIL descritos en el presente documento si el número total de células viables en el día 14 es menor que el número inicial de células viables puestas en cultivo en el día 0 de la primera expansión de cebado.

[0572] En algunas realizaciones, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y aceptables para su uso en los procedimientos de expansión de TIL aquí descritos si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, en el día 7 no ha aumentado desde el número inicial de células viables puestas en cultivo en el día 0 de la primera expansión de cebado. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 6000 UI/ml de IL-2.

[0573] En algunas realizaciones, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y aceptables para su uso en los procedimientos de expansión de TIL aquí descritos si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, en el día 7 no ha aumentado desde el número inicial de células viables puestas en cultivo en el día 0 de la primera expansión de cebado. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 5-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 1000-6000 UI/ml de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 10-50 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 2000-5000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 20-40 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 2000-4000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 25-35 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 2500-3500 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 15 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 15 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 6000 UI/ml de IL-2.

[0574] En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno son PBMCs. En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno son células alimentadoras presentadoras de antígeno artificiales. En una realización, la proporción de TIL respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de aproximadamente 1 a 25, aproximadamente 1 a 50, aproximadamente 1 a 100, aproximadamente 1 a 125, aproximadamente 1 a 150, aproximadamente 1 a 175, aproximadamente 1 a 200, aproximadamente 1 a 225, aproximadamente 1 a 250, aproximadamente 1 a 275, aproximadamente 1 a 300, aproximadamente 1 a 325, aproximadamente 1 a 350, aproximadamente 1 a 375, aproximadamente 1 a 400, o aproximadamente 1 a 500. En una realización, la proporción de TIL respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de entre 1 a 50 y 1 a 300. En una realización, la proporción de TIL respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de entre 1 a 100 y 1 a 200.

[0575] En una realización, los procedimientos de primera expansión de cebado descritos aquí requieren una proporción de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras para aproximadamente 100×10^6 TILs. En otra realización, los procedimientos de primera expansión de cebado descritos en el presente documento requieren una proporción de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras por aproximadamente 50×10^6 TILs. En otra realización, la primera expansión de cebado descrita en el presente documento requiere aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras para aproximadamente 25×10^6 TILs. En otra realización, la primera expansión de cebado descrita en el presente documento requiere aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras. En otra realización, la primera expansión de cebado requiere un cuarto, un tercio, cinco doceavos, o la mitad del número de células alimentadoras utilizadas en la segunda expansión rápida.

[0576] En algunas realizaciones, el medio en la primera expansión de cebado comprende IL-2. En algunas realizaciones,

los medios en la primera expansión de cebado comprenden 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el medio en la primera expansión de cebado comprende células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, el medio en la primera expansión de cebado comprende 2,5 × 10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno por contenedor. En algunas realizaciones, el medio en la primera expansión de cebado comprende OKT-3. En algunas realizaciones, el medio comprende 30 ng de OKT-3 por envase. En algunas realizaciones, el recipiente es un matraz GREX100 MCS. En algunas realizaciones, el medio comprende 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3 y 2,5 × 10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, el medio comprende 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3 y 2,5 ×10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno por envase. En algunas realizaciones, el medio comprende 500 mL de medio de cultivo y 15 µg de OKT-3 por 2,5 × 10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno por recipiente. En algunas realizaciones, el medio comprende 500 mL de medio de cultivo y 15 µg de OKT-3 por envase. En algunas realizaciones, el recipiente es un matraz GREX100 MCS. En algunas realizaciones, el medio comprende 500 mL de medio de cultivo, 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3 y 2,5 × 10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, el medio comprende 500 mL de medio de cultivo, 6000 UI/mL de IL-2, 15 µg de OKT-3 y 2,5 × 10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno por recipiente. En algunas realizaciones, el medio comprende 500 mL de medio de cultivo y 15 µg de OKT-3 por 2,5 × 10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno por recipiente.

[0577] En una realización, los procedimientos de primera expansión de cebado descritos aquí requieren un exceso de células alimentadoras sobre TILs durante la segunda expansión. En muchas realizaciones, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de unidades de sangre total estándar de donantes de sangre sanos alogénicos. Las PBMC se obtienen utilizando métodos estándar como la separación en gradiente Ficoll-Paque. En una realización, se utilizan células artificiales presentadoras de antígeno (aAPC) en lugar de PBMC.

[0578] En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se utilizan en los procedimientos de expansión de TIL descritos en el presente documento, incluidos los procedimientos ejemplares descritos en las figuras y ejemplos.

[0579] En una realización, las células presentadoras de antígeno artificiales se utilizan en la primera expansión de cebado como un reemplazo para, o en combinación con, PBMCs.

2. Citocinas

[0580] Los métodos de expansión aquí descritos generalmente utilizan medios de cultivo con altas dosis de una citoquina, en particular IL-2, como es conocido en la técnica.

[0581] Alternativamente, es posible usar combinaciones de citoquinas para la primera expansión de TILs, con combinaciones de dos o más de IL-2, IL-15 e IL-21 como se describe generalmente en la Publicación Internacional N.º WO 2015/189356 y WO 2015/189357. Por lo tanto, las combinaciones posibles incluyen IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21, e IL-2, IL-15 e IL-21, siendo esta última la más utilizada en muchas realizaciones. El uso de combinaciones de citoquinas favorece específicamente la generación de linfocitos y, en particular, de células T, tal como se describe en el presente documento.

TABLA 20: Secuencias de aminoácidos de las interleucinas.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 3: IL-2 humana recombinante (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 133
SEQ ID N.º 4: Aldesleucina	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID N.º 5: IL-4 humana recombinante (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQST LENFLERLKT IMREKYSKCS	60 120 130
SEQ ID N.º 6: IL-7 humana recombinante (rhIL-7)	MDCDIEGHDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 133
SEQ ID N.º 7: IL-15 humana recombinante (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLII LANNSLSSNG NVTESGCKEC EELEEKNIKE FLQSFVHIVQ MFIN	60 113
SEQ ID N.º 8: IL-21 humana recombinante (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

C. ETAPA C: Transición de la Primera Expansión de Cebado para la Segunda Expansión Rápida

[0582] En algunos casos, la población de TIL a granel obtenida de la primera expansión de cebado (que puede incluir expansiones a veces denominadas pre-REP), incluyendo, por ejemplo la población de TIL obtenida de, por ejemplo, la Etapa B como se indica en la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), puede someterse a una segunda expansión rápida (que puede incluir expansiones a veces denominadas Protocolo de Expansión Rápida (REP)) y luego criopreservarse como se discute a continuación. Del mismo modo, en el caso de que se vayan a utilizar TIL modificados genéticamente en terapia, la población TIL expandida de la primera expansión de cebado o la población TIL expandida de la segunda expansión rápida pueden someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados antes de la etapa de expansión o después de la primera expansión de cebado y antes de la segunda expansión rápida.

[0583] En algunas realizaciones, los TIL obtenidos de la primera expansión de cebado (por ejemplo, de la Etapa B como se indica en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 8C)) se almacenan hasta que se fenotipan para la selección. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos de la primera expansión de cebado (por ejemplo, de la Etapa B como se indica en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 8C)) no se almacenan y pasan directamente a la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos de la primera expansión de cebado no se criopreservan después de la primera expansión de cebado y antes de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce aproximadamente a los 2 días, 3 días, 4, días, 5 días, 6 días, 7 días, u 8 días desde que se produce la fragmentación del tumor y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce en aproximadamente 3 días a 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce en aproximadamente 3 días a 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce en aproximadamente 4 días a 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce en aproximadamente 4 días a 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de

expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce en aproximadamente 5 días a 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce en aproximadamente 5 días a 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce en aproximadamente 6 días a 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce en aproximadamente 6 días a 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce en aproximadamente 7 días a 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce a los 7 días aproximadamente desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce a los 8 días aproximadamente desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado.

[0584] En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida ocurre en 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, u 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce entre 1 día y 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce entre 1 día y 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce entre 2 días y 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce entre 2 días y 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce entre 3 días y 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión se produce entre 3 días y 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce entre 4 y 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce entre 4 y 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce entre 5 y 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce entre 5 y 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce entre 6 y 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce entre 6 y 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce entre 7 y 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce a los 7 días de producirse la fragmentación y/o de iniciarse la primera etapa de expansión de cebado. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida se produce a los 8 días de producirse la fragmentación y/o de iniciarse la primera etapa de expansión de cebado.

[0585] En algunas realizaciones, los TIL no se almacenan después de la primera expansión primaria y antes de la segunda expansión rápida, y los TILs proceden directamente a la segunda expansión rápida (por ejemplo, en algunas realizaciones, no hay almacenamiento durante la transición de la Etapa B al Etapa D como se muestra en la Figura 8 (en particular, por ejemplo, Figura 8B y/o Figura 8C)). En algunas realizaciones, la transición se produce en un sistema cerrado, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los TIL de la primera expansión de cebado, la segunda población de TIL, pasa directamente a la segunda expansión rápida sin periodo de transición.

[0586] En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida, por ejemplo, la Etapa C según la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea un único biorreactor. En algunas realizaciones, el biorreactor único empleado es, por ejemplo, un GREX-10 o un GREX-100. En algunas realizaciones, el biorreactor de sistema cerrado es un único biorreactor. En algunas realizaciones, la transición de la primera expansión de cebado a la segunda expansión rápida implica un aumento del tamaño del recipiente. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado se lleva a cabo en un recipiente más pequeño que la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la primera expansión de cebado se lleva a cabo en un GREX-100 y la segunda expansión rápida en un GREX-500.

D. ETAPA D: Segunda Expansión Rápida

[0587] En algunas realizaciones, la población de células TIL se expande aún más en número después de la recolección y la primera expansión de cebado, después de la Etapa A y la Etapa B, y la transición denominada Etapa C, como se indica en la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C)). Esta expansión adicional se denomina en el presente documento segunda expansión rápida, que puede incluir procesos de expansión generalmente denominados en la técnica proceso de expansión rápida (Rapid Expansion Protocol o REP; así como procesos como los indicados en la Etapa D de la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B)). La segunda expansión rápida se logra generalmente utilizando un medio de cultivo que comprende una serie de componentes, incluyendo células alimentadoras, una fuente de citoquinas y un anticuerpo anti-CD3, en un recipiente permeable al gas. En algunas realizaciones, 1 día, 2 días, 3 días, o 4 días después del inicio de la segunda expansión rápida (es decir, en los días 8, 9, 10, u 11 del proceso general Gen 3), los TIL se transfieren a un contenedor de mayor volumen.

[0588] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida (que puede incluir expansiones a veces denominadas REP; así como procesos como los indicados en la Etapa D de la Figura 1 (en particular, p. ej., Figura 1B y/o Figura 8C)) de TIL puede realizarse utilizando cualquier matraz o recipiente de TIL conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, o 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 1 día a aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 2 días a aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 2 días a aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 3 días a aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 3 días a aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 4 días a aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 4 días a aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 5 días a aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 5 días a aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 6 días a aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 6 días a aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 7 días a aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 7 días a aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 8 días a aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 8 días a aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede proceder durante aproximadamente 9 días a aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 1 día tras el inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 2 días tras el inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 3 días tras el inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 4 días tras el inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 5 días tras el inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 6 días tras el inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 7 días tras el inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 8 días tras el inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 9 días tras el inicio de la segunda expansión rápida. En algunas realizaciones, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 10 días tras el inicio de la segunda expansión rápida.

[0589] En una realización, la segunda expansión rápida puede llevarse a cabo en un recipiente permeable al gas utilizando los métodos de la presente divulgación (incluyendo, por ejemplo, expansiones denominadas REP; así como procesos como los indicados en la Etapa D de la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C). Los TIL se expanden en la segunda expansión rápida en presencia de IL-2, OKT-3, y células alimentadoras (también denominadas en el presente documento "células presentadoras de antígeno"). En algunas realizaciones, los TIL se expanden en la segunda expansión rápida en presencia de IL-2, OKT-3 y células alimentadoras, en las que las células alimentadoras se añaden a una concentración final que es el doble, 2,4 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces o 4 veces la concentración de

células alimentadoras presentes en la primera expansión de cebado. Por ejemplo, los TIL pueden expandirse rápidamente utilizando la estimulación inespecífica del receptor de células T en presencia de interleucina-2 (IL-2) o interleucina-15 (IL-15). El estímulo no específico del receptor de células T puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3, como unos 30 ng/ml de OKT3, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 (disponible comercialmente en Ortho-McNeil, Raritan, NJ o Miltenyi Biotech, Auburn, CA) o UHCT-1 (disponible comercialmente en BioLegend, San Diego, CA, EE.UU.). Los TIL pueden expandirse para inducir una mayor estimulación de los TIL *in vitro* mediante la inclusión de uno o más antígenos durante la segunda expansión, incluyendo porciones antigénicas de los mismos, tales como epítopo(s), del cáncer, que pueden expresarse opcionalmente a partir de un vector, tal como un péptido de unión al antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), *por ejemplo,* 0,3 µM MART-1:26-35 (27 L) o gpl 00:209-217 (210M), opcionalmente en presencia de un factor de crecimiento de células T, como 300 UI/mL IL-2 o IL-15. Otros antígenos adecuados pueden incluir, por ejemplo, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno del cáncer de tirosinasa, MAGE-A3, SSX-2, y VEGFR2, o porciones antigénicas de los mismos. Los TIL también pueden expandirse rápidamente mediante la reestimulación con el mismo antígeno o antígenos del cáncer pulsados sobre células presentadoras de antígenos que expresan HLA-A2. Alternativamente, los TIL pueden ser reestimulados adicionalmente con, por ejemplo, linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2. En algunas realizaciones, la reestimulación se produce como parte de la segunda expansión. En algunas realizaciones, la segunda expansión se produce en presencia de linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2.

[0590] En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 1000 UI/mL, alrededor de 1500 UI/mL, alrededor de 2000 UI/mL, alrededor de 2500 UI/mL, alrededor de 3000 UI/mL, alrededor de 3500 UI/mL, alrededor de 4000 UI/mL, alrededor de 4500 UI/mL, alrededor de 5000 UI/mL, alrededor de 5500 UI/mL, alrededor de 6000 UI/mL, alrededor de 6500 UI/mL, alrededor de 7000 UI/mL, alrededor de 7500 UI/mL, o alrededor de 8000 UI/mL de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 1000 y 2000 UI/mL, entre 2000 y 3000 UI/mL, entre 3000 y 4000 UI/mL, entre 4000 y 5000 UI/mL, entre 5000 y 6000 UI/mL, entre 6000 y 7000 UI/mL, entre 7000 y 8000 UI/mL, o entre 8000 UI/mL de IL-2.

[0591] El medio de cultivo celular comprende el anticuerpo OKT-3. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 30 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,1 ng/ml, aproximadamente 0,5 ng/ml, aproximadamente 1 ng/ml, aproximadamente 2,5 ng/ml, aproximadamente 5 ng/ml, aproximadamente 7,5 ng/ml, aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 15 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 25 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml, aproximadamente 35 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 70 ng/ml, aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 90 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, y aproximadamente 1 µg/ml del anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 0,1 ng/mL y 1 ng/mL, entre 1 ng/mL y 5 ng/mL, entre 5 ng/mL y 10 ng/mL, entre 10 ng/mL y 20 ng/mL, entre 20 ng/mL y 30 ng/mL, entre 30 ng/mL y 40 ng/mL, entre 40 ng/mL y 50 ng/mL, y entre 50 ng/mL y 100 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 15 ng/ml y 30 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 30 ng/ml y 60 ng/mL de anticuerpo OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 30 ng/mL de OKT-3. En una realización, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 60 ng/mL de OKT-3. En algunas realizaciones, el anticuerpo OKT-3 es muromonab.

[0592] En algunas realizaciones, el medio en la segunda expansión rápida comprende IL-2. En algunas realizaciones, el medio comprende 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el medio en la segunda expansión rápida comprende células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, el medio en la segunda expansión rápida comprende $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras presentadoras de antígeno por contenedor. Los medios de la segunda expansión rápida comprenden OKT-3. En algunas realizaciones, el medio de segunda expansión rápida comprende 500 mL de medio de cultivo y 30 µg de OKT-3 por envase. En algunas realizaciones, el recipiente es un matraz GREX100 MCS. En algunas realizaciones, el medio de segunda expansión rápida comprende 6000 UI/mL de IL-2, 60 ng/mL de OKT-3 y $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, el medio comprende 500 mL de medio de cultivo y 6000 UI/mL de IL-2, 30 µg de OKT-3, y $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras presentadoras de antígeno por recipiente.

[0593] En algunas realizaciones, el medio en la segunda expansión rápida comprende IL-2. En algunas realizaciones, el medio comprende 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el medio en la segunda expansión rápida comprende células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, el medio comprende entre 5×10^8 y $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras presentadoras de antígeno por envase. Los medios de la segunda expansión rápida comprenden OKT-3. En algunas realizaciones, el medio de la segunda expansión rápida comprende 500 mL de medio de cultivo y 30 µg de OKT-3 por envase. En algunas realizaciones, el recipiente es un matraz GREX100 MCS. En algunas realizaciones, el medio en la segunda expansión rápida comprende 6000 UI/mL de IL-2, 60 ng/mL de OKT-3, y entre 5×10^8 y $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, el medio de la segunda expansión rápida comprende 500 mL de medio de cultivo y 6000 UI/mL de IL-2, 30 µg de OKT-3, y entre 5×10^8 y $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras presentadoras de antígeno por contenedor.

[0594] En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende uno o más agonistas de TNFRSF en un medio de

cultivo celular. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF comprende un agonista del 4-1BB. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF es un agonista 4-1BB, y el agonista 4-1BB se selecciona del grupo que consiste en urelumab, utomilumab, EU-101, una proteína de fusión, y fragmentos, derivados, variantes, biosimilares y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF se añade a una concentración suficiente para alcanzar una concentración en el medio de cultivo celular de entre 0,1 µg/mL y 100 µg/mL. En algunas realizaciones, el agonista del TNFRSF se añade a una concentración suficiente para alcanzar una concentración en el medio de cultivo celular de entre 20 µg/mL y 40 µg/mL.

[0595] En algunas realizaciones, además de uno o más agonistas del TNFRSF, el medio de cultivo celular comprende además IL-2 a una concentración inicial de aproximadamente 3000 UI/mL y anticuerpo OKT-3 a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/mL, y en donde el uno o más agonistas del TNFRSF comprende un agonista 4-1BB.

[0596] En algunas realizaciones, se emplea una combinación de IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21 durante la segunda expansión. En algunas realizaciones, IL-2, IL-7, IL-15, y/o IL-21, así como cualquier combinación de las mismas, pueden incluirse durante la segunda expansión, incluyendo, por ejemplo durante un proceso de la Etapa D según la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea una combinación de IL-2, IL-15, e IL-21 durante la segunda expansión. En algunas realizaciones, la IL-2, la IL-15, y la IL-21, así como cualquier combinación de las mismas, pueden incluirse durante los procesos de la Etapa D según la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B y/o la Figura 8C) y según se describe en el presente documento.

[0597] En algunas realizaciones, la segunda expansión puede llevarse a cabo en un medio de cultivo celular suplementado que comprenda IL-2, OKT-3, células alimentadoras presentadoras de antígeno y, opcionalmente, un agonista del TNFRSF. En algunas realizaciones, la segunda expansión se produce en un medio de cultivo celular suplementado. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular suplementado comprende IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APCs; también denominadas células alimentadoras presentadoras de antígeno). En algunas realizaciones, la segunda expansión se produce en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno (*es decir,* células presentadoras de antígeno).

[0598] En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 500 UI/mL de IL-15, alrededor de 400 UI/mL de IL-15, alrededor de 300 UI/mL de IL-15, alrededor de 200 UI/mL de IL-15, alrededor de 180 UI/mL de IL-15, alrededor de 160 UI/mL de IL-15, alrededor de 140 UI/mL de IL-15, alrededor de 120 UI/mL de IL-15, o alrededor de 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 500 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 400 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 300 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 200 UI/mL de IL-15. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-15. En una realización preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15.

[0599] En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 20 UI/mL de IL-21, alrededor de 15 UI/mL de IL-21, alrededor de 12 UI/mL de IL-21, alrededor de 10 UI/mL de IL-21, alrededor de 5 UI/mL de IL-21, alrededor de 4 UI/mL de IL-21, alrededor de 3 UI/mL de IL-21, alrededor de 2 UI/mL de IL-21, alrededor de 1 UI/mL de IL-21, o alrededor de 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 20 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 15 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 12 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 10 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 5 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 2 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-21. En una realización preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21.

[0600] En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno (APCs) son PBMCs. En una realización, la relación de TIL a PBMC y/o células presentadoras de antígeno en la expansión rápida y/o la segunda expansión es de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 1 a 15, aproximadamente 1 a 20, aproximadamente 1 a 25, aproximadamente 1 a 30, aproximadamente 1 a 35, aproximadamente 1 a 40, aproximadamente 1 a 45, aproximadamente 1 a 50, aproximadamente 1 a 75, aproximadamente 1 a 100, aproximadamente 1 a 125, aproximadamente 1 a 150, aproximadamente 1 a 175, aproximadamente 1 a 200, aproximadamente 1 a 225, aproximadamente 1 a 250, aproximadamente 1 a 275, aproximadamente 1 a 300, aproximadamente 1 a 325, aproximadamente 1 a 350, aproximadamente 1 a 375, aproximadamente 1 a 400, o aproximadamente 1 a 500. En una realización, la proporción de TILs a PBMCs en la expansión rápida y/o la segunda expansión está entre 1 a 50 y 1 a 300. En una realización, la

proporción de TILs a PBMCs en la expansión rápida y/o la segunda expansión es entre 1 a 100 y 1 a 200.

[0601] En una realización, el REP y/o la segunda expansión rápida se lleva a cabo en matraces con los TILs a granel mezclados con un exceso de 100 o 200 veces de células alimentadoras inactivadas, en donde la concentración de células alimentadoras es al menos 1.1 veces (1.1X), 1.2X, 1.3X, 1.4X, 1.5X, 1.6X, 1.7X, 1.8X, 1.8X, 2X, 2.1X2.2X, 2.3X, 2.4X, 2.5X, 2.6X, 2.7X, 2.8X, 2.9X, 3.0X, 3.1X, 3.2X, 3.3X, 3.4X, 3.5X, 3.6X, 3.7X, 3.8X, 3.9X o 4.0X la concentración de células alimentadoras en la primera expansión de cebado, 30 ng/mL de anticuerpo OKT3 anti-CD3 y 6000 UI/mL de IL-2 en 150 ml de medio. Se sustituyen los medios (generalmente 2/3 de los medios mediante aspiración de 2/3 de los medios gastados y sustitución por un volumen igual de medios frescos) hasta que las células se transfieren a una cámara de crecimiento alternativa. Entre las cámaras de crecimiento alternativas se incluyen los matraces G-REX y los contenedores permeables a los gases, como se explica más detalladamente a continuación.

[0602] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida (que puede incluir procesos denominados proceso REP) es de 7 a 9 días, como se discute en los ejemplos y figuras. En algunas realizaciones, la segunda expansión es de 7 días. En algunas realizaciones, la segunda expansión es de 8 días. En algunas realizaciones, la segunda expansión es de 9 días.

[0603] En una realización, la segunda expansión (que puede incluir expansiones denominadas REP, así como las denominadas en la Etapa D de la Figura 8 (en particular, p. ej., Figura 8B y/o Figura 8C) puede realizarse en matraces permeables al gas de 500 mL de capacidad con fondos de silicona permeables al gas de 100 cm (G-Rex 100, disponible comercialmente de Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, EE.UU.), 5×10^6 o 10×10^6 TIL pueden cultivarse con PBMC en 400 mL de medio 50/50, suplementado con 5% de suero AB humano, 3000 UI por mL de IL-2 y 30 ng por ml de anti-CD3 (OKT3). Los matraces G-Rex 100 pueden incubarse a 37°C en un 5% de CO_2. El día 5, pueden extraerse 250 mL de sobrenadante y colocarse en frascos de centrífuga y centrifugarse a 1500 rpm (491 × g) durante 10 minutos. Los pellets de TIL pueden volver a suspenderse con 150 mL de medio fresco con 5% de suero AB humano, 6000 UI por mL de IL-2, y añadirse de nuevo a los matraces GREX-100 originales. Cuando los TIL se expanden en serie en frascos GREX-100, en el día 10 u 11 los TIL pueden trasladarse a un frasco más grande, como un GREX-500. Las células pueden ser recolecciónd as en el día 14 de cultivo. Las células pueden ser recolecciónd as en el día 15 de cultivo. Las células pueden ser recolecciónd as en el día 16 de cultivo. En algunas realizaciones, la sustitución de los medios se lleva a cabo hasta que las células se transfieren a una cámara de crecimiento alternativa. En algunas realizaciones, 2/3 de los medios se sustituyen por aspiración de los medios gastados y sustitución por un volumen igual de medios frescos. En algunas realizaciones, las cámaras de crecimiento alternativas incluyen matraces GREX y recipientes permeables a los gases, como se explica con más detalle a continuación.

[0604] En algunas realizaciones, el medio de cultivo utilizado en los procesos de expansión aquí divulgados es un medio libre de suero o un medio definido. En algunas realizaciones, el medio libre de suero o definido comprende un medio celular basal y un suplemento de suero y/o un sustituto de suero. En algunas realizaciones, el medio libre de suero o definido se utiliza para prevenir y/o disminuir la variación experimental debida en parte a la variación lote a lote de los medios que contienen suero.

[0605] En algunas realizaciones, el medio libre de suero o definido comprende un medio celular basal y un suplemento de suero y/o un reemplazo de suero. En algunas realizaciones, el medio celular basal incluye, entre otros, CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium, CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, CTS™ AIM-V Medium, CTS™ AIM-V SFM, LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimal Essential Medium (MEM), Basal Medium Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Minimal Essential Medium (αMEM), Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM), RPMI growth medium y Iscove's Modified Dulbecco's Medium.

[0606] En algunas realizaciones, el suplemento de suero o el reemplazo de suero incluye, pero no se limita a uno o más de CTS™ OpTmizer T-Cell Expansion Serum Supplement, CTS™ Immune Cell Serum Replacement, una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más antibióticos, y uno o más oligoelementos. En algunas realizaciones, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contengan oligoelementos Ag^+, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^+, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas realizaciones, el medio definido comprende además L-glutamina, bicarbonato sódico y/o 2-mercaptoetanol.

[0607] En algunas realizaciones, el CTS™OpTmizer™ T-cell Immune Cell Serum Replacement se utiliza con medios de crecimiento convencionales, incluidos, incluyendo pero no limitado a, CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium, CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM, CTS™ AIM-V Medium, CST™ AIM-V SFM, LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimal Essential Medium (MEM), Basal Medium Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Minimal Essential Medium (αMEM), Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM), RPMI growth medium, y Iscove's Modified Dulbecco's Medium.

[0608] En algunas realizaciones, la concentración total de reemplazo de suero (vol%) en el medio libre de suero o definido

es de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, o 20% en volumen del medio total libre de suero o definido. En algunas realizaciones, la concentración total de sustitución de suero es de aproximadamente el 3% del volumen total del medio libre de suero o medio definido. En algunas realizaciones, la concentración total de sustitución de suero es de aproximadamente el 5% del volumen total del medio libre de suero o medio definido. En algunas realizaciones, la concentración total de sustitución de suero es de aproximadamente el 10% del volumen total del medio libre de suero o medio definido.

[0609] En algunas realizaciones, el medio libre de suero o definido es CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM es una combinación de 1 L de CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium y 26 mL de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que se mezclan antes de su uso. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se suplementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55mM.

[0610] En algunas realizaciones, el medio definido es CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM es una combinación de 1 L de CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium y 26 mL de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que se mezclan antes de su uso. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se suplementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55mM. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55mM de 2-mercaptoetanol y 2mM de L-glutamina. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55mM de 2-mercaptoetanol, y 2mM de L-glutamina, y comprende además de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55mM de 2-mercaptoetanol y 2mM de L-glutamina, y comprende además aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific), 55mM de 2-mercaptoetanol y 2mM de L-glutamina, y comprende además aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y 55mM de 2-mercaptoetanol, y comprende además entre aproximadamente 1000 UI/mL y aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y 55mM de 2-mercaptoetanol, y comprende además aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y 55mM de 2-mercaptoetanol, y comprende además de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2mM de glutamina, y comprende además entre aproximadamente 1000 UI/mL y aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™™ T-cell Expansion SFM se suplementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2mM de glutamina, y comprende además aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas realizaciones, el CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM se complementa con aproximadamente un 3% del CTS™ Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2mM de glutamina, y comprende además aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2.

[0611] En algunas realizaciones, el medio libre de suero o medio definido se suplementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 0,1mM a aproximadamente 10mM, 0,5mM a aproximadamente 9mM, 1mM a aproximadamente 8mM, 2mM a aproximadamente 7mM, 3mM a aproximadamente 6mM, o 4mM a aproximadamente 5 mM. En algunas realizaciones, el medio libre de suero o medio definido se suplementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 2mM.

[0612] En algunas realizaciones, el medio libre de suero o medio definido es suplementado con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, 10 mM a aproximadamente 140 mM, 15 mM a aproximadamente 130 mM, 20 mM a aproximadamente 120 mM, 25 mM a aproximadamente 110 mM, 30 mM a aproximadamente 100 mM, 35 mM a aproximadamente 95 mM, 40 mM a aproximadamente 90 mM, 45 mM a aproximadamente 85 mM, 50 mM a aproximadamente 80 mM, 55 mM a aproximadamente 75 mM, 60 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 65 mM. En algunas realizaciones, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 55mM.

[0613] En algunas realizaciones, los medios definidos descritos en la Publicación Internacional PCT N.º WO/1998/030679 son útiles en la presente invención. En esa publicación se describen medios de cultivo de células eucariotas sin suero. El medio de cultivo de células eucariotas sin suero incluye un medio de cultivo celular basal suplementado con un suplemento sin suero capaz de soportar el crecimiento de células en cultivo sin suero. El suplemento de medio de cultivo de células eucariotas sin suero comprende o se obtiene combinando uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste

en una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más oligoelementos, y uno o más antibióticos. En algunas realizaciones, el medio definido comprende además L-glutamina, bicarbonato sódico y/o beta-mercaptoetanol. En algunas realizaciones, el medio definido comprende una albúmina o un sustituto de albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, y uno o más oligoelementos. En algunas realizaciones, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contengan oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas realizaciones, el medio celular basal se selecciona del grupo que consiste en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), Medio Esencial Mínimo (MEM), Medio Basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), medio de crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado de Iscove.

[0614] En algunas realizaciones, la concentración de glicina en el medio definido está en el rango de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-histidina es de aproximadamente 5-250 mg/L, la concentración de L-isoleucina es de aproximadamente 5-300 mg/L, la concentración de L-metionina es de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-fenilalanina es de unos 5-400 mg/L, la concentración de L-prolina es de unos 1-1000 mg/L, la concentración de L-hidroxiprolina es de unos 1-45 mg/L, la concentración de L-serina es de unos 1-250 mg/L, la concentración de L-treonina es de unos 10-500 mg/L, la concentración de L-triptófano es de unos 2-110 mg/L, la concentración de L-tirosina es de unos 3-175 mg/L, la concentración de L-valina es de unos 5-500 mg/L, la concentración de tiamina es de unos 1-20 mg/L, la concentración de glutatión reducido es de unos 1-20 mg/L, la concentración de ácido L-ascórbico-2-fosfato es de aproximadamente 1-200 mg/L, la concentración de transferrina saturada de hierro es de aproximadamente 1-50 mg/L, la concentración de insulina es de aproximadamente 1-100 mg/L, la concentración de selenito sódico es de aproximadamente 0,000001-0,0001 mg/L, y la concentración de albúmina (p. ej, AlbuMAX® I) es de unos 5000-50.000 mg/L.

[0615] En algunas realizaciones, los ingredientes de moléculas de elementos no traza en el medio definido están presentes en los rangos de concentración enumerados en la columna bajo el título "Intervalo de Concentración en Medio 1X" en la Tabla A a continuación. En otras realizaciones, los ingredientes de la fracción no oligoelemento en el medio definido están presentes en las concentraciones finales enumeradas en la columna bajo el título "Una realización preferida del medio 1X" en la Tabla A a continuación. En otras realizaciones, el medio definido es un medio celular basal que comprende un suplemento libre de suero. En algunas de estas realizaciones, el suplemento libre de suero comprende ingredientes no traza del tipo y en las concentraciones enumeradas en la columna bajo el título "Una Realización Preferida en Suplemento" en la Tabla A a continuación.

Tabla A: Concentraciones de ingredientes que no son elementos traza

Ingrediente	Una realización preferida en suplemento (mg/L) (Aproximadamente)	Intervalo de concentración en medio 1X (mg/L) (Aproximadamente)	Una realización preferida en medio 1X (mg/L) (Aproximadamente)
Glicina	150	5-200	53
L-histidina	940	5-250	183
L-Isoleucina	3400	5-300	615
L-metionina	90	5-200	44
L-Fenilalanina	1800	5-400	336
L-Prolina	4000	1-1000	600
L-hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-treonina	2200	10-500	425
L-triptófano	440	2-110	82
L-Tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454
Tiamina	33	1-20	9
Glutatión reducido	10	1-20	1,5
Ácido ascórbico-2-PO_4 (sal de Mg)	330	1-200	50
Transferrina (saturada de hierro)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10
Selenito sódico	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83.000	5000-50.000	12.500

[0616] En algunas realizaciones, la osmolaridad del medio definido está entre aproximadamente 260 y 350 mOsmol. En

algunas realizaciones, la osmolaridad está entre 280 y 310 mOsmol. En algunas realizaciones, el medio definido se complementa con hasta aproximadamente 3,7 g/L, o aproximadamente 2,2 g/L de bicarbonato de sodio. El medio definido puede suplementarse además con L-glutamina (concentración final de aproximadamente 2 mM), uno o más antibióticos, aminoácidos no esenciales (NEAA; concentración final de aproximadamente 100 µM), 2-mercaptoetanol (concentración final de aproximadamente 100 µM).

[0617] En algunas realizaciones, los medios definidos descritos en Smith, et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement," Clin Transl Immunology, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) son útiles en la presente invención. Brevemente, se utilizó RPMI o CTS™ OpTmizer™ como medio celular basal, y se suplementó con 0, 2%, 5% o 10% de CTS™ Immune Cell Serum Replacement.

[0618] En una realización, el medio celular en el primer y/o segundo contenedor permeable al gas no está filtrado. El uso de un medio celular no filtrado puede simplificar los procedimientos necesarios para ampliar el número de células. En una realización, el medio celular en el primer y/o segundo contenedor permeable al gas carece de beta-mercaptoetanol (BME o βME; también conocido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

[0619] En una realización, la segunda expansión rápida (incluidas las expansiones denominadas REP) se lleva a cabo y comprende además una etapa donde laos TIL se seleccionan para una reactividad tumoral superior. Puede utilizarse cualquier método de selección conocido en la técnica. Por ejemplo, los métodos descritos en Publicación de solicitud de patente n.º 2016/0010058 A1, puede utilizarse para la selección de TIL para una reactividad tumoral superior.

[0620] Opcionalmente, puede realizarse un ensayo de viabilidad celular después de la segunda expansión rápida (incluidas las expansiones denominadas expansión REP), utilizando ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de exclusión con azul tripán en una muestra de TIL, que marca selectivamente las células muertas y permite evaluar la viabilidad. En algunas realizaciones, las muestras de TIL pueden contarse y determinarse su viabilidad utilizando un contador celular automatizado Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). En algunas realizaciones, la viabilidad se determina según el protocolo estándar del Contador Celular Automático del Citómetro de Imagen Cellometer K2.

[0621] Los diversos receptores de antígenos de los linfocitos T y B se producen por recombinación somática de un número limitado, pero grande, de segmentos génicos. Estos segmentos de genes: V (variable), D (diversidad), J (unión), y C (constante), determinan la especificidad de unión y las aplicaciones posteriores de las inmunoglobulinas y los receptores de células T (TCR). La presente invención proporciona un método para generar TILs que exhiben y aumentan la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos por el presente método muestran un aumento de la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos en la segunda expansión muestran un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, el aumento de la diversidad es un aumento de la diversidad de inmunoglobulinas y/o de la diversidad de receptores de células T. En algunas realizaciones, la diversidad está en la inmunoglobulina está en la cadena pesada de la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la diversidad está en la inmunoglobulina está en la cadena ligera de la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la diversidad está en el receptor de células T. En algunas realizaciones, la diversidad está en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma, y delta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) alfa. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión de TCRab *(es decir,* TCRα/β).

[0622] El medio de cultivo de segunda expansión rápida (*por ejemplo*, a veces denominado CM2 o el segundo medio de cultivo celular), comprende IL-2, OKT-3, así como las células alimentadoras presentadoras de antígeno (APCs), como se discute en más detalle a continuación. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de segunda expansión rápida (*p. ej.*, a veces denominado CM2 o el segundo medio de cultivo celular), comprende 6000 UI/mL de IL-2, 30 ug/frasco de OKT-3, así como 7,5 × 10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno (APC), como se explica con más detalle a continuación. El medio de cultivo de segunda expansión rápida (*p. ej.*, a veces denominado CM2 o segundo medio de cultivo celular), comprende IL-2, OKT-3, así como las células alimentadoras presentadoras de antígeno (APC), como se explica con más detalle a continuación. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de segunda expansión rápida (*p. ej.*, a veces denominado CM2 o el segundo medio de cultivo celular), comprende 6000 UI/mL de IL-2, 30 ug/frasco de OKT-3, así como 5 × 10^8 células alimentadoras presentadoras de antígeno (APC), como se explica con más detalle a continuación.

[0623] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida, por ejemplo, la Etapa D según la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C), se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea un biorreactor. En algunas realizaciones, se emplea un biorreactor como contenedor. En algunas realizaciones, el biorreactor empleado es, por ejemplo, un G-REX-100 o un G-REX-500. En algunas realizaciones, el biorreactor empleado es un G-REX-100. En algunas realizaciones, el biorreactor empleado es un G-REX-500.

1. Células alimentadoras y células presentadoras de antígeno

[0624] En una realización, los procedimientos de segunda expansión rápida descritos en el presente documento (por ejemplo, incluyendo expansión como las descritas en la Etapa D de la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), así como los denominados REP) requieren un exceso de células alimentadoras durante la expansión de TIL REP y/o durante la segunda expansión rápida. En muchas realizaciones, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de unidades de sangre total estándar de donantes de sangre sanos. Las PBMC se obtienen utilizando métodos estándar como la separación en gradiente Ficoll-Paque.

[0625] En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se utilizan en los procedimientos REP, como se describe en los ejemplos, que proporciona un protocolo ejemplar para evaluar la incompetencia de replicación de PBMC alogénicas irradiadas.

[0626] En algunas realizaciones, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y aceptables para su uso en los procedimientos de expansión de TIL descritos en el presente documento si el número total de células viables en el día 7 o 14 es inferior al número inicial de células viables puestas en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (*es decir,* el día de inicio de la segunda expansión).

[0627] En algunas realizaciones, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para su uso en los procedimientos de expansión de TIL aquí descritos si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 y el día 14 no ha aumentado desde el número inicial de células viables puestas en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (*es decir,* el día de inicio de la segunda expansión). En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 60 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 6000 UI/ml de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 60 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 6000 UI/ml de IL-2.

[0628] En algunas realizaciones, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para su uso en los procedimientos de expansión de TIL aquí descritos si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 y el día 14 no ha aumentado desde el número inicial de células viables puestas en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (*es decir,* el día de inicio de la segunda expansión). En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 1000-6000 UI/ml IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 2000-5000 UI/ml IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 2000-4000 UI/ml IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 2500-3500 UI/ml IL-2. En algunas realizaciones, las PBMC se cultivan en presencia de 30-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 6000 UI/ml IL-2.

[0629] En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno son PBMCs. En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno son células alimentadoras presentadoras de antígeno artificiales. En una realización, la proporción de TIL respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 1 a 25, aproximadamente 1 a 50, aproximadamente 1 a 100, aproximadamente 1 a 125, aproximadamente 1 a 150, aproximadamente 1 a 175, aproximadamente 1 a 200, aproximadamente 1 a 225, aproximadamente 1 a 250, aproximadamente 1 a 275, aproximadamente 1 a 300, aproximadamente 1 a 325, aproximadamente 1 a 350, aproximadamente 1 a 375, aproximadamente 1 a 400, o aproximadamente 1 a 500. En una realización, la proporción de TIL respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de entre 1 a 50 y 1 a 300. En una realización, la proporción de TIL respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de entre 1 a 100 y 1 a 200.

[0630] En una realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en el presente documento requieren una proporción de aproximadamente 5×10^8 células alimentadoras por aproximadamente 100×10^6 TIL. En una realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en el presente documento requieren una proporción de aproximadamente $7{,}5 \times 10^8$ células alimentadoras por aproximadamente 100×10^6 TIL. En otra realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en el presente documento requieren una proporción de aproximadamente 5×10^8 células alimentadoras para aproximadamente 50×10^6 TIL. En otra realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en el presente documento requieren una proporción de aproximadamente $7{,}5 \times 10^8$ células alimentadoras para aproximadamente 50×10^6 TIL. En otra realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en el presente documento requieren aproximadamente 5×10^8 células alimentadoras para aproximadamente 25×10^6 TIL. En otra realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en el presente documento requieren aproximadamente $7{,}5 \times 10^8$ células alimentadoras para aproximadamente 25×10^6 TIL. En otra realización, la segunda expansión rápida requiere el doble de células alimentadoras que la segunda expansión rápida. En otra realización, cuando la primera expansión de cebado aquí descrita requiere aproximadamente $2{,}5 \times 10^8$ células alimentadoras, la segunda expansión rápida requiere aproximadamente 5×10^8 células alimentadoras. En otra realización, cuando la primera expansión de cebado aquí descrita requiere aproximadamente $2{,}5 \times 10^8$ células alimentadoras, la segunda expansión rápida requiere aproximadamente $7{,}5 \times 10^8$ células alimentadoras. En otra realización, la segunda expansión rápida requiere dos veces (2,0X), 2,5X, 3,0X, 3,5X o 4,0X el número de células alimentadoras que la primera expansión de cebado.

[0631] En una realización, los procedimientos de segunda expansión rápida aquí descritos requieren un exceso de células

alimentadoras durante la segunda expansión rápida. En muchas realizaciones, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de unidades de sangre total estándar de donantes de sangre sanos alogénicos. Las PBMC se obtienen utilizando métodos estándar como la separación en gradiente Ficoll-Paque. En una realización, se utilizan células artificiales presentadoras de antígeno (aAPC) en lugar de PBMC. En algunas realizaciones, las PBMC se añaden a la segunda expansión rápida al doble de la concentración de PBMC que se añadieron a la primera expansión de cebado.

[0632] En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se utilizan en los procedimientos de expansión de TIL descritos en el presente documento, incluidos los procedimientos ejemplares descritos en las figuras y ejemplos.

[0633] En una realización, las células presentadoras de antígeno artificiales se utilizan en la segunda expansión rápida como un reemplazo para, o en combinación con, PBMCs.

2. Citocinas

[0634] Los métodos de segunda expansión rápida aquí descritos generalmente utilizan medios de cultivo con altas dosis de una citoquina, en particular IL-2, como es conocido en la técnica.

[0635] Alternativamente, es posible usar combinaciones de citoquinas para la segunda expansión rápida de TILs, con combinaciones de dos o más de IL-2, IL-15 e IL-21 como se describe en general en WO 2015/189356 y WO 2015/189357. Por lo tanto, las combinaciones posibles incluyen IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21, e IL-2, IL-15 e IL-21, siendo esta última la más utilizada en muchas realizaciones. El uso de combinaciones de citoquinas favorece específicamente la generación de linfocitos y, en particular, de células T, tal como se describe en el presente documento.

E. ETAPA E: Recolección TILS

[0636] Después de la segunda etapa de expansión rápida, las células pueden ser recolecciónndas. En algunas realizaciones, los TIL se recolecciónn después de uno, dos, tres, cuatro o más etapas de expansión, por ejemplo, como se muestra en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C). En algunas realizaciones, los TIL se recolecciónn después de dos etapas de expansión, por ejemplo, como se muestra en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C). En algunas realizaciones, los TIL se recolecciónn después de dos etapas de expansión, una primera expansión de cebado y una segunda expansión rápida, por ejemplo, como se muestra en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C).

[0637] Los TIL se pueden recolecciónr de cualquier manera apropiada y estéril, incluyendo, por ejemplo por centrifugación. Los métodos para la recolección de TIL son bien conocidos en la técnica y cualquiera de estos métodos conocidos puede emplearse con el presente proceso. En algunas realizaciones, los TILS se recolecciónn utilizando un sistema automatizado.

[0638] Las recolecciónd oras de células y/o los sistemas de procesamiento celular están disponibles comercialmente de una variedad de fuentes, incluyendo, por ejemplo, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer, e Inotech Biosystems International, Inc. Cualquier recolecciónd ora basada en células puede emplearse con los presentes métodos. En algunas realizaciones, el recolecciónd or celular y/o el sistema de procesamiento celular es un recolecciónd or celular basado en membranas. En algunas realizaciones, la recolección de células se realiza mediante un sistema de procesamiento celular, como el sistema LOVO (fabricado por Fresenius Kabi). El término "sistema de procesamiento celular LOVO" también se refiere a cualquier instrumento o dispositivo fabricado por cualquier proveedor que pueda bombear una solución que comprenda células a través de una membrana o filtro, como una membrana giratoria o un filtro giratorio, en un entorno de sistema estéril y/o cerrado, que permita el flujo continuo y el procesamiento celular para eliminar el sobrenadante o el medio de cultivo celular sin peletización. En algunas realizaciones, el recolecciónd or celular y/o el sistema de procesamiento celular pueden llevar a cabo la separación celular, el lavado, el intercambio de fluidos, la concentración y/u otras etapas de procesamiento celular en un sistema cerrado y estéril.

[0639] En algunas realizaciones, la segunda expansión rápida, por ejemplo, la Etapa D según la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C), se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se emplea un biorreactor. En algunas realizaciones, se emplea un biorreactor como contenedor. En algunas realizaciones, el biorreactor empleado es, por ejemplo, un G-REX-100 o un G-REX-500. En algunas realizaciones, el biorreactor empleado es un G-REX-100. En algunas realizaciones, el biorreactor empleado es un G-REX-500.

[0640] En algunas realizaciones, la Etapa E según la Figura 8 (en particular, *por ejemplo, la* Figura 8B y/o la Figura 8C), se realiza según los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, se accede al sistema cerrado mediante jeringuillas en condiciones estériles para mantener la esterilidad y la naturaleza cerrada del sistema. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado como el aquí descrito.

[0641] En algunas realizaciones, los TIL se recolecciónn de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, los TIL entre los días 14 y 16 se recolecciónn utilizando los métodos aquí descritos. En algunas realizaciones, los TIL se recolecciónn a los 14 días utilizando los métodos aquí descritos. En algunas realizaciones, los TIL se recolecciónn a los 15 días utilizando los métodos aquí descritos. En algunas realizaciones, los TIL se recolecciónn a los 16 días utilizando los métodos aquí descritos.

F. ETAPA F: Formulación final/ Transferencia a la bolsa de infusión

[0642] Una vez completados las Etapas A a E según se proporcionan en un orden ejemplar en la Figura 8 (en particular, p. ej., la Figura 8B) y según se describe en detalle anteriormente y en el presente documento, las células se transfieren a un recipiente para su uso en la administración a un paciente. En algunas realizaciones, una vez obtenido un número terapéuticamente suficiente de TIL mediante los métodos de expansión descritos anteriormente, se transfieren a un recipiente para su uso en la administración a un paciente.

[0643] En una realización, los TIL expandidos usando los métodos de la presente divulgación se administran a un paciente como una composición farmacéutica. En una realización, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un tampón estéril. Los TIL expandidos como se describe en el presente documento pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, los TIL se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferiblemente dura aproximadamente de 30 a 60 minutos. Otras vías de administración adecuadas son la intraperitoneal, la intratecal, y la intralinfática.

G. Ratios de células alimentadoras PBMC

[0644] Los medios de cultivo utilizados en los métodos de expansión descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C)) incluyen un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo OKT-3. Un anticuerpo anti-CD3 en combinación con IL-2 induce la activación de las células T y la división celular en la población TIL. Este efecto puede observarse con anticuerpos de longitud completa, así como con fragmentos Fab y F(ab')2, prefiriéndose generalmente los primeros; véase, *por ejemplo,* Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719.

[0645] En una realización, el número de capas alimentadoras de PBMC se calcula como sigue:

A. Volumen de una célula T (10 µm de diámetro): $V = (4/3)\,\pi r^3 = 523{,}6\ \mu m^3$

B. Columna de G-Rex 100 (M) con una altura de 40 µm (4 células): $V = (4/3)\,\pi r^3 = 4\times10^{12}\ \mu m^3$

C. Número de células necesario para rellenar la columna B: $4\times10^{12}\ \mu m^3 / 523{,}6\ \mu m^3 = 7{,}6\times10^{8}\ \mu m^3 * 0{,}64 = 4{,}86\times10^{8}$

D. Número de células que pueden activarse de forma óptima en el espacio 4D: $4{,}86\times10^{8} / 24 = 20{,}25\times10^{6}$

E. Número de alimentadores y TIL extrapolados a G-Rex 500: TIL: 100×10^{6} y Alimentador: $2{,}5\times10^{9}$

[0646] En este cálculo, se utiliza una aproximación del número de células mononucleares necesarias para proporcionar una geometría icosaédrica para la activación de TIL en un cilindro con una base de 100 cm^2. El cálculo deriva el resultado experimental de ~5×10^{8} para la activación umbral de las células T, que refleja fielmente los datos experimentales del NCI.[(1)] (C) El multiplicador (0,64) es la densidad de empaquetamiento aleatorio para esferas equivalentes calculada por Jaeger y Nagel en 1992 [(2)]. (D) El divisor 24 es el número de esferas equivalentes que podrían entrar en contacto con un objeto similar en un espacio de 4 dimensiones "the Newton number."[(3)].

[(1)] Jin, Jianjian, et.al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr; 35(3): 283-292.

[(2)] Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992.

[(3)] O. R. Musin (2003). "The problem of the twenty-five spheres". Russ. Math. Surv. 58 (4): 794-795.

[0647] En una realización, el número de células alimentadoras presentadoras de antígeno suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado es aproximadamente la mitad del número de células alimentadoras presentadoras de antígeno suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida. En ciertas realizaciones, el método comprende llevar a cabo la primera expansión de cebado en un medio de cultivo celular que comprende aproximadamente un 50% menos de células presentadoras de antígeno en comparación con el medio de cultivo celular de la segunda expansión rápida.

[0648] En otra realización, el número de células alimentadoras presentadoras de antígeno (APC) suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida es mayor que el número de APC suministradas exógenamente

durante la primera expansión de cebado.

[0649] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 20:1 aproximadamente.

[0650] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 10 aproximadamente. 1.

[0651] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 9:1 aproximadamente.

[0652] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 8:1 aproximadamente.

[0653] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 7:1 aproximadamente.

[0654] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 6:1 aproximadamente.

[0655] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 5:1 aproximadamente.

[0656] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 4:1 aproximadamente.

[0657] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 3:1 aproximadamente.

[0658] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 2.9:1 aproximadamente.

[0659] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 2.8:1 aproximadamente.

[0660] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 2.7:1 aproximadamente.

[0661] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 2.6:1 aproximadamente.

[0662] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 2.5:1 aproximadamente.

[0663] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 2.4:1 aproximadamente.

[0664] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 2.3:1 aproximadamente.

[0665] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 2.2:1 aproximadamente.

[0666] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 2.1:1 aproximadamente.

[0667] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 1,1:1 a 2:1 aproximadamente.

[0668] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 10 aproximadamente. 1.

[0669] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 5:1 aproximadamente.

[0670] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 4:1 aproximadamente.

[0671] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 3:1 aproximadamente.

[0672] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 2.9:1 aproximadamente.

[0673] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 2.8:1 aproximadamente.

[0674] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 2.7:1 aproximadamente.

[0675] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 2.6:1 aproximadamente.

[0676] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 2.5:1 aproximadamente.

[0677] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 2.4 aproximadamente. 1.

[0678] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 2.3:1 aproximadamente.

[0679] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 2.2:1 aproximadamente.

[0680] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de 2:1 a 2.1:1 aproximadamente.

[0681] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado es de 2:1 o

aproximadamente.

[0682] En otra realización, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado es de o aproximadamente 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 2:1, 2.1:1, 2.2:1, 2.3:1, 2.4:1, 2.5:1, 2.6:1, 2.7:1, 2.8:1, 2.9:1, 3:1, 3.1:1, 3.2:1, 3.3:1, 3.4:1, 3.5:1, 3.6:1, 3.7:1, 3.8:1, 3.9:1, 4:1, 4.1:1, 4.2:1, 4.3:1, 4.4:1, 4.5:1, 4.6:1, 4.7:1, 4.8:1, 4.9:1, o 5:1.

[0683] En otra realización, el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado es de o aproximadamente 1×10^8, 1.1×10^8, 1.2×10^8, 1.3×10^8, 1.4×10^8, 1.5×10^8, 1.6×10^8, 1.7×10^8, 1.8×10^8, 1.9×10^8, 2×10^8, 2.1×10^8, 2.2×10^8, 2.3×10^8, $2.4x10^8$, 2.5×10^8, 2.6×10^8, 2.7×10^8, 2.8×10^8, 2.9×10^8, 3×10^8, $3.1x10^8$, 3.2×10^8, 3.3×10^8, 3.4×10^8 o 3.5×10^8 APCs, y el número de APCs suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida es de, o aproximadamente 3.5×10^8, 3.6×10^8, 3.7×10^8, 3.8×10^8, 3.9×10^8, 4×10^8, 4.1×10^8, 4.2×10^8, 4.3×10^8 4.4×10^8, 4.5×10^8, 4.6×10^8, 4.7×10^8, 4.8×10^8, 4.9×10^8, 5×10^8, 5.1×10^8, 5.2×10^8, 5.3×10^8, 5.4×10^8, 5.5×10^8, 5.6×10^8, 5.7×10^8, 5.8×10^8, 5.9×10^8, 6×10^8, 6.1×10^8, 6.2×10^8, 6.3×10^8, 6.4×10^8, 6.5×10^8, 6.6×10^8, 6.7×10^8, 6.8×10^8, 6.9×10^8, 7×10^8, 7.1×10^8, 7.2×10^8, 7.3×10^8 7.4×10^8, 7.5×10^8, 7.6×10^8, 7.7×10^8, 7.8×10^8, 7.9×10^8, 8×10^8, 8.1×10^8, 8.2×10^8, 8.3×10^8, 8.4×10^8, 8.5×10^8, 8.6×10^8, 8.7×10^8, 8.8×10^8, 8.9×10^8, 9×10^8, 9.1×10^8, 9.2×10^8, 9.3×10^8, 9.4×10^8, 9.5×10^8, 9.6×10^8, 9.7×10^8, 9.8×10^8, 9.9×10^8 o 1×10^9 APCs.

[0684] En otra realización, el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona entre $1,5\times10^8$ APC y 3×10^8 APC, y el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida se selecciona entre 4×10^8 APC y $7,5\times10^8$ APC.

[0685] En otra realización, el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado se selecciona entre 2×10^8 APC y $2,5\times10^8$ APC, y el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida se selecciona entre 4.5×10^8 APC y $5,5\times10^8$ APC.

[0686] En otra realización, el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión de cebado es de o aproximadamente $2,5\times10^8$ APC, y el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida es de o aproximadamente 5×10^8 APC.

[0687] En una realización, el número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) añadidas en el día 0 de la primera expansión de cebado es aproximadamente la mitad del número de PBMCs añadidas en el día 7 de la primera expansión de cebado (por ejemplo, día 7 del método). En ciertas realizaciones, el método comprende añadir células presentadoras de antígeno en el día 0 de la primera expansión de cebado a la primera población de TIL y añadir células presentadoras de antígeno en el día 7 a la segunda población de TIL, en el que el número de células presentadoras de antígeno añadidas en el día 0 es aproximadamente el 50% del número de células presentadoras de antígeno añadidas en el día 7 de la primera expansión de cebado (por ejemplo, el día 7 del método).

[0688] En otra realización, el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida es mayor que el número de PBMC suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado.

[0689] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión de cebado se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de entre $1,0\times10^6$ APC/cm^2 y $4,5\times10^6$ APC/cm^2.

[0690] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión de cebado se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de entre $1,5\times10^6$ APC/cm^2 y $3,5\times10^6$ APC/cm^2.

[0691] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión de cebado se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de entre 2×10^6 APC/cm^2 y 3×10^6 APC/cm^2.

[0692] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión de cebado se siembran en el matraz de cultivo a una densidad de al menos 2×10^6 APC/cm^2.

[0693] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión de cebado se siembran en el matraz de cultivo a una densidad de al menos aproximadamente 1.0×10^6, 1.1×10^6, 1.2×10^6, 1.3×10^6, 1.4×10^6, 1.5×10^6, 1.6×10^6, 1.7×10^6, 1.8×10^6, 1.9×10^6, 2×10^6, 2.1×10^6, 2.2×10^6, 2.3×10^6, 2.4×10^6, 2.5×10^6, 2.6×10^6, 2.7×10^6, 2.8×10^6, 2.9×10^6, 3×10^6, 3.1×10^6, 3.2×10^6, 3.3×10^6, 3.4×10^6, 3.5×10^6, 3.6×10^6, 3.7×10^6, 3.8×10^6, 3.9×10^6, 4×10^6, 4.1×10^6, 4.2×10^6, 4.3×10^6, 4.4×10^6 o 4.5×10^6 APCs/cm^2.

[0694] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de un intervalo de al menos aproximadamente $2,5\times10^6$ APC/cm^2 a al menos aproximadamente $7,5\times10^6$ APC/cm^2.

[0695] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el

matraz de cultivo a una densidad seleccionada de un intervalo de al menos aproximadamente $3,5\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $6,0\times10^6$ APC/cm^2.

[0696] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de un intervalo de al menos aproximadamente $4,0\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $5,5\times10^6$ APC/cm^2.

[0697] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de un intervalo de al menos $4,0\times10^6$ APC/cm^2.

[0698] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el matraz de cultivo a una densidad de al menos 2.5×10^6 APCs/cm^2, 2.6×10^6 APCs/cm^2, 2.7×10^6 APCs/cm^2, 2.8×10^6, 2.9×10^6, 3×10^6, 3.1×10^6, 3.2×10^6, 3.3×10^6, 3.4×10^6, 3.5×10^6, $3.6x10^6$, 3.7×10^6, 3.8×10^6, 3.9×10^6, 4×10^6, 4.1×10^6, 4.2×10^6, 4.3×10^6, 4.4×10^6, 4.5×10^6, 4.6×10^6, 4.7×10^6, 4.8×10^6, 4.9×10^6, 5×10^6, 5.1×10^6, 5.2×10^6, 5.3×10^6, 5.4×10^6, 5.5×10^6, 5.6×10^6, 5.7×10^6, 5.8×10^6, 5.9×10^6, 6×10^6, 6.1×10^6, 6.2×10^6, 6.3×10^6, 6.4×10^6, 6.5×10^6, 6.6×10^6, 6.7×10^6, 6.8×10^6, 6.9×10^6, 7×10^6, 7.1×10^6, 7.2×10^6, 7.3×10^6, 7.4×10^6 o 7.5×10^6 APCs/cm^2.

[0699] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión de cebado se siembran en el matraz de cultivo a una densidad de al menos 1.0×10^6, 1.1×10^6, 1.2×10^6, 1.3×10^6, 1.4×10^6, 1.5×10^6, 1.6×10^6, 1.7×10^6, 1.8×10^6, 1.9×10^6, 2×10^6, 2.1×10^6, 2.2×10^6, 2.3×10^6, 2.4×10^6, 2.5×10^6, 2.6×10^6, 17×10^6, 2.8×10^6, 2.9×10^6, 3×10^6, 3.1×10^6, 3.2×10^6, 3.3×10^6, 3.4×10^6, 3.5×10^6, 3.6×10^6, 3.7×10^6, 3.8×10^6, 3.9×10^6, 4×10^6, 4.1×10^6, 4.2×10^6, 4.3×10^6, 4.4×10^6 o 4.5×10^6 APCs/cm^2 y las APCs suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el matraz de cultivo a una densidad igual o superior a 2.5×10^6 APCs/cm^2, 2.6×10^6 APCs/cm^2, 2.7×10^6 APCs/cm^2, 2.8×10^6, 2.9×10^6, 3×10^6, 3.1×10^6, 3.2×10^6, 3.3×10^6, 3.4×10^6, 3.5×10^6, 3.6×10^6, 3.7×10^6, 3.8×10^6, 3.9×10^6, 4×10^6, 4.1×10^6, 4.2×10^6, 4.3×10^6, 4.4×10^6, 4.5×10^6, 4.6×10^6, 4.7×10^6, 4.8×10^6, 4.9×10^6, 5×10^6, 5.1×10^6, 5.2×10^6, 5.3×10^6, 5.4×10^6, 5.5×10^6, 5.6×10^6, 5.7×10^6, 5.8×10^6, 5.9×10^6, 6×10^6, 6.1×10^6, 6.2×10^6, 6.3×10^6, 6.4×10^6, 6.5×10^6, 6.6×10^6, 6.7×10^6, 6.8×10^6, 6.9×10^6, 7×10^6, 7.1×10^6, 7.2×10^6, 7.3×10^6, 7.4×10^6 o 7.5×10^6 APCs/cm^2.

[0700] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión de cebado se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de un intervalo de $1,0\times10^6$ APC/cm^2 a $4,5\times10^6$ APC/cm^2, y las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de un intervalo de $2,5\times10^6$ APC/cm^2 a $7,5\times10^6$ APC/cm^2.

[0701] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión de cebado se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de un intervalo de $1,5\times10^6$ APC/cm^2 a $3,5\times10^6$ APC/cm^2, y las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de un intervalo de $3,5\times10^6$ APC/cm^2 a 6×10^6 APC/cm^2.

[0702] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión de cebado se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de un intervalo de 2×10^6 APC/cm^2 a 3×10^6 APC/cm^2, y las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el matraz de cultivo a una densidad seleccionada de un intervalo de 4×10^6 APC/cm^2 a $5,5\times10^6$ APC/cm^2.

[0703] En otra realización, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión de cebado se siembran en el matraz de cultivo a una densidad de o aproximadamente 2×10^6 APC/cm^2 y las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el matraz de cultivo a una densidad de o aproximadamente 4×10^6 APC/cm^2.

[0704] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de PBMC suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de entre 1,1:1 y 20:1 aproximadamente.

[0705] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de PBMC suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de entre 1,1:1 y 10 aproximadamente. 1.

[0706] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de PBMC suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona en un intervalo de entre 1,1:1 y 9:1 aproximadamente.

[0707] **En** otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 8:1 aproximadamente.

[0708] **En** otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC)

suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 7:1 aproximadamente.

[0709] **En** otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 6:1 aproximadamente.

[0710] **En** otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 5:1 aproximadamente.

[0711] **En** otra realización, la relación entre el número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) exógenamente suministradas en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APCs

[0712] (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) exógenamente suministrado en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un rango de entre al menos aproximadamente 1,1:1 a al menos aproximadamente 4:1.

[0713] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 3:1 aproximadamente.

[0714] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.9:1 aproximadamente.

[0715] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.8:1 aproximadamente.

[0716] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.7:1 aproximadamente.

[0717] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.6:1 aproximadamente.

[0718] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.5:1 aproximadamente.

[0719] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.4:1 aproximadamente.

[0720] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.3:1 aproximadamente.

[0721] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.2:1 aproximadamente.

[0722] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC)

suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.1:1 aproximadamente.

[0723] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2:1 aproximadamente.

[0724] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 10 aproximadamente. 1.

[0725] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 5:1 aproximadamente.

[0726] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 4:1 aproximadamente.

[0727] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 3:1 aproximadamente.

[0728] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.9:1 aproximadamente.

[0729] **En** otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.8:1 aproximadamente.

[0730] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.7:1 aproximadamente.

[0731] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.6:1 aproximadamente.

[0732] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.5:1 aproximadamente.

[0733] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.4:1 aproximadamente.

[0734] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.3:1 aproximadamente.

[0735] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y

2.2:1 aproximadamente.

[0736] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.1:1 aproximadamente.

[0737] En otra realización, la relación entre el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado es de 2:1 o aproximadamente.

[0738] En otra realización, la relación del número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) exógenamente suministradas en el día 7 de la segunda expansión rápida al número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) exógenamente suministradas en el día 0 de la primera expansión de cebado es de o aproximadamente 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 2:1, 2.1:1, 2.2:1, 2.3:1, 2.4:1, 2.5:1, 2.6:1, 2.7:1, 2.8:1, 2.9:1, 3:1, 3.1:1, 3.2:1, 3.3:1, 3.4:1, 3.5:1, 3.6:1, 3.7:1, 3.8:1, 3.9:1, 4:4:1, 4.1:1, 4.2:1, 4.3:1, 4.4:1, 4.5:1, 4.6:1, 4.7:1, 4.8:1, 4.9:1, o 5:1.

[0739] En otra realización, el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministrado exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado es de o aproximadamente 1×10^8, 1.1×10^8, 1.2×10^8, 1.3×10^8, $1.4x10^8$, 1.5×10^8, 1.6×10^8, 1.7×10^8, 1.8×10^8, 1.9×10^8, 2×10^8, 2.1×10^8, 2.2×10^8, 2.3×10^8, 2.4×10^8, 2.5×10^8, 2.6×10^8, 2.7×10^8, 2.8×10^8, 2.9×10^8, 3×10^8, 3.1×10^8, 3.2×10^8, 3.3×10^8, 3.4×10^8 o 3.5×10^8 APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC), y el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida es igual o similar a 3.5×10^8, 3.6×10^8, 3.7×10^8, 3.8×10^8, 3.9×10^8, 4×10^8, 4.1×10^8, 4.2×10^8, 4.3×10^8, 4.4×10^8, 4.5×10^8, 4.6×10^8, 4.7×10^8, 4.8×10^8, 4.9×10^8, 5×10^8, 5.1×10^8, 5.2×10^8, 5.3×10^8, 5.4×10^8, 5.5×10^8, 5.6×10^8, 5.7×10^8, 5.8×10^8, 5.9×10^8, 6×10^8, 6.1×10^8, 6.2×10^8, 6.3×10^8, 6.4×10^8, 6.5×10^8, 6.6×10^8, 6.7×10^8, 6.8×10^8, 6.9×10^8, 7×10^8, 7.1×10^8, 7.2×10^8, 7.3×10^8, 7.4×10^8, 7.5×10^8, 7.6×10^8, 7.7×10^8, 7.8×10^8, 7.9×10^8, 8×10^8, 8.1×10^8, 8.2×10^8, 8.3×10^8, 8.4×10^8, 8.5×10^8, 8.6×10^8, 8.7×10^8, 8.8×10^8, 8.9×10^8, 9×10^8, 9.1×10^8, 9.2×10^8, 9.3×10^8, 9.4×10^8, 9.5×10^8, 9.6×10^8, 9.7×10^8, 9.8×10^8, 9.9×10^8 o 1×10^9 APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC).

[0740] En otra realización, el número de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona del intervalo de en o aproximadamente 1×10^8 APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC) a en o aproximadamente $3,5\times10^8$ APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC), y el número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de en o aproximadamente $3,5\times10^8$ APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC) a en o aproximadamente 1×10^9 APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC).

[0741] En otra realización, el número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona del intervalo de en o aproximadamente $1,5 \times 10^8$ APCs a en o aproximadamente 3×10^8 APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC), y el número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de en o aproximadamente 4×10^8 APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC) a en o aproximadamente $7,5 \times 10^8$ APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC).

[0742] En otra realización, el número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado se selecciona del intervalo de en o aproximadamente 2×10^8 APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC) a en o aproximadamente $2,5\times10^8$ APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC), y el número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de en o aproximadamente $4,5\times10^8$ APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC) a en o aproximadamente $5,5\times10^8$ APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMC).

[0743] En otra realización, el número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) exógenamente suministradas en el día 0 de la primera expansión de cebado es de o aproximadamente $2,5\times10^8$ APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) y el número de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) exógenamente suministradas en el día 7 de la segunda expansión rápida es de o aproximadamente 5×10^8 APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs).

[0744] En una realización, el número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) añadidas en el día 0 de la primera expansión de cebado es aproximadamente la mitad del número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) añadidas en el día 7 de la segunda expansión rápida. En ciertas realizaciones, el método comprende añadir capas de células presentadoras de antígeno en el día 0 de la primera expansión de cebado a la primera población de TILs y añadir capas de células presentadoras de antígeno en el día 7 a la segunda población de TILs, en el que el número de capas de células presentadoras de antígeno añadidas en el día 0 es aproximadamente el 50% del número de capas de células presentadoras de antígeno añadidas en el día 7.

[0745] En otra realización, el número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida es mayor que el número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión de cebado.

[0746] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de al menos 2 capas celulares y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de al menos 4 capas celulares.

[0747] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un espesor medio de al menos una capa celular y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un espesor medio de al menos 3 capas celulares.

[0748] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de al menos 1,5 capas celulares a al menos 2,5 capas celulares y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un espesor medio de al menos 3 capas celulares.

[0749] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un espesor medio de al menos una capa celular y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un espesor medio de al menos 2 capas celulares.

[0750] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC en capas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un espesor medio de al menos 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 29 o 3 capas celulares y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC en capas (incluidas, por ejemplo, PBMC) con un espesor medio de al menos 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 o 8 capas celulares.

[0751] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de al menos 1 capa celular a al menos 2 capas celulares y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de al menos 3 capas celulares a al menos 10 capas celulares.

[0752] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de al menos 2 capa celular a al menos 3 capas celulares y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de al menos 4 capas celulares a al menos 8 capas celulares.

[0753] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de al menos 2 capas celulares y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de al menos 4 capas celulares a al menos 8 capas celulares.

[0754] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de 1, 2 o 3 capas celulares y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un grosor medio de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 capas celulares.

[0755] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.1 a 1:10.

[0756] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.1 a 1:8 aproximadamente.

[0757] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo,

por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.1 a 1:7 aproximadamente.

[0758] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.1 a 1:6 aproximadamente.

[0759] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.1 a 1:5 aproximadamente.

[0760] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.1 a 1:4 aproximadamente.

[0761] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.1 a 1:3 aproximadamente.

[0762] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.1 a 1:2 aproximadamente.

[0763] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.2 a 1:8 aproximadamente.

[0764] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.3 a 1:7 aproximadamente.

[0765] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al

segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.4 a 1:6 aproximadamente.

[0766] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.5 a 1:5 aproximadamente.

[0767] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.6 a 1:4 aproximadamente.

[0768] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.7 a 1:3.5 aproximadamente.

[0769] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.8 a 1:3 aproximadamente.

[0770] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo grosor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona del intervalo de en o alrededor de 1:1.9 a 1:2.5 aproximadamente.

[0771] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo espesor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) es igual o aproximadamente 1: 2.

[0772] En otra realización, el día 0 de la primera expansión de cebado se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor medio igual a un primer número de capas de APC (incluyendo, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC estratificadas (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) con un segundo espesor medio igual a un segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs), en donde la relación del primer número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) al segundo número de capas de APCs (incluyendo, por ejemplo, PBMCs) se selecciona de en o alrededor de 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9, 1:2, 1:2.1, 1:2.2, 1:2.3, 1:2.4, 1:2.5, 1:2.6, 1:2.7, 1:2.8, 1:2.9, 1:3, 1:3.1, 1:3.2, 1:3.3, 1:3.4, 1:3.5, 1:3.6, 1:3.7, 1:3.8, 1:3.9, 1:4, 1:4.1, 1:4.2, 1:4.3, 1:4.4, 1:4.5, 1:4.6, 1:4.7, 1:4.8, 1:4.9, 1:5, 1:5.1, 1:5.2, 1:5.3, 1:5.4, 1:5.5, 1:5.6, 1:5.7, 1:5.8, 1:5.9, 1:6, 1:6.1, 1:6.2, 1:6.3, 1:6.4, 1:6.5, 1:6.6, 1:6.7, 1:6.8, 1:6.9, 1:7, 1:7.1, 1:7.2, 1:7.3, 1:7.4, 1:7.5, 1:7.6, 1:7.7, 1:7.8, 1:7.9, 1:8, 1:8.1, 1:8.2, 1:8.3, 1:8.4, 1:8.5, 1:8.6, 1:8.7, 1:8.8, 1:8.9, 1:9, 1:9.1, 1:9.2, 1:9.3, 1:9.4, 1:9.5, 1:9.6, 1:9.7, 1:9.8, 1:9.9 o 1:10.

[0773] En algunas realizaciones, el número de APCs en la primera expansión de cebado se selecciona del intervalo de aproximadamente $1,0\times10^6$ APCs/cm^2 a aproximadamente $4,5\times10^6$ APCs/cm^2, y el número de APCs en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente $2,5\times10^6$ APCs/cm^2 a aproximadamente $7,5\times10^6$ APCs/cm^2.

[0774] En algunas realizaciones, el número de APCs en la primera expansión de cebado se selecciona del intervalo de aproximadamente $1,5\times10^6$ APCs/cm^2 a aproximadamente $3,5\times10^6$ APCs/cm^2, y el número de APCs en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente $3,5\times10^6$ APCs/cm^2 a aproximadamente $6,0\times10^6$ APCs/cm^2.

[0775] En algunas realizaciones, el número de APCs en la primera expansión de cebado se selecciona del intervalo de aproximadamente $2,0\times10^6$ APCs/cm^2 a aproximadamente $3,0\times10^6$ APCs/cm^2, y el número de APCs en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente $4,0\times10^6$ APCs/cm^2 a aproximadamente $5,5\times10^6$ APCs/cm^2.

H. Componentes opcionales del medio celular

1. Anticuerpos anti-CD3

[0776] Los medios de cultivo utilizados en los métodos de expansión descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B)) incluyen un anticuerpo anti-CD3. Un anticuerpo anti-CD3 en combinación con IL-2 induce la activación de las células T y la división celular en la población TIL. Este efecto puede observarse con anticuerpos de longitud completa, así como con fragmentos Fab y F(ab')2, prefiriéndose generalmente los primeros; véase, *por ejemplo,* Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719.

[0777] Como será apreciado por aquellos en la técnica, hay un número de anticuerpos anti CD3 humanos adecuados que encuentran uso en la invención, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales anti CD3 humanos de varios mamíferos, incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos murinos, humanos, primates, ratas, y caninos. En particular, se utiliza el anticuerpo OKT3 anti-CD3 (disponible comercialmente en Ortho-McNeil, Raritan, NJ o Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

TABLA 21: Secuencias de aminoácidos de muromonab (anticuerpo OKT-3 ejemplar)

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 1: Cadena pesada de Muromonab	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY	60
	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA	120
	KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL	180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRG PKPKSPDKTH TCPPCPAPEL LGG	240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300
	STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE	360
	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW	420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	450
SEQ ID N.º 2: Cadena ligera Muromonab	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMHWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH	60
	FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS	120
	SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL	180
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	213

2. AGONISTAS 4-1BB (CD137)

[0778] En una realización, el medio de cultivo celular de la primera expansión de cebado y/o la segunda expansión rápida comprende un agonista del TNFRSF. En una realización, el agonista del TNFRSF es un agonista de 4-1BB (CD137). El agonista 4-1BB puede ser cualquier molécula de unión 4-1BB conocida en la técnica. La molécula de unión a 4-1BB puede ser un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión capaz de unirse a 4-1BB humano o de mamífero. Los agonistas 4-1BB o las moléculas de unión 4-1BB pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isotipo (*por ejemplo,* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*por ejemplo,* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. El agonista 4-1BB o la molécula de unión 4-1BB puede tener tanto una cadena pesada como una ligera. Tal como se utiliza en el presente documento, el término molécula de unión también incluye anticuerpos (incluidos anticuerpos de longitud completa), anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (*p. ej.*, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, y fragmentos de anticuerpos, *por ejemplo*, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos

producidos por una biblioteca de expresión Fab, fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores, y formas modificadas de anticuerpos, *por ejemplo*, moléculas scFv, que se unen a 4-1BB. En una realización, el agonista 4-1BB es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo totalmente humano. En una realización, el agonista 4-1BB es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, los agonistas 4-1BB para su uso en los métodos y composiciones actualmente divulgados incluyen anticuerpos anti-4-1BB, anticuerpos humanos anti-4-1BB, anticuerpos de ratón anti-4-1BB, anticuerpos de mamífero anti-4-1BB, anticuerpos monoclonales anti-4-1BB, anticuerpos policlonales anti-4-1BB, anticuerpos quiméricos anti-4-1BB, adnectinas anti-4-1BB, anticuerpos de dominio anti-4-1BB, fragmentos anti-4-1BB de cadena simple, fragmentos anti-4-1BB de cadena pesada, fragmentos anti-4-1BB de cadena ligera, proteínas de fusión anti-4-1BB, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, o biosimilares de los mismos. Se sabe que los anticuerpos agonistas anti-4-1BB inducen fuertes respuestas inmunitarias. Lee, et al., PLOS One 2013, 8, e69677. En una realización preferida, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal agonista, anti-4-1BB humanizado o totalmente humano (*es decir,* un anticuerpo derivado de una única línea celular). En una realización, el agonista 4-1BB es EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), utomilumab, o urelumab, o un fragmento, derivado, conjugado, variante, o biosimilar del mismo. En una realización preferida, el agonista 4-1BB es utomilumab o urelumab, o un fragmento, derivado, conjugado, variante o biosimilar del mismo.

[0779] En una realización preferida, el agonista 4-1BB o la molécula de unión 4-1BB también puede ser una proteína de fusión. En una realización preferida, un agonista 4-1BB multimérico, como un agonista 4-1BB trimérico o hexamérico (con tres o seis dominios de unión al ligando), puede inducir una agrupación superior del receptor (4-1BBL) y la formación de complejos de señalización celular interna en comparación con un anticuerpo monoclonal agonista, que típicamente posee dos dominios de unión al ligando. Las proteínas de fusión triméricas (trivalentes) o hexaméricas (o hexavalentes) o mayores que comprenden tres dominios de unión a TNFRSF e IgG1-Fc y que opcionalmente unen además dos o más de estas proteínas de fusión se describen, *por ejemplo,* en Gieffers, et al., Mol.

[0780] Se sabe que los anticuerpos 4-1BB agonísticos y las proteínas de fusión inducen fuertes respuestas inmunitarias. En una realización preferida, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión que se une específicamente al antígeno 4-1BB de manera suficiente para reducir la toxicidad. En algunas realizaciones, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal 4-1BB agonista o una proteína de fusión que anula la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo la citotoxicidad de células NK. En algunas realizaciones, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal 4-1BB agonista o una proteína de fusión que anula la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). En algunas realizaciones, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal 4-1BB agonista o una proteína de fusión que anula la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En algunas realizaciones, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal 4-1BB agonista o una proteína de fusión que anula la funcionalidad de la región Fc.

[0781] En algunas realizaciones, los agonistas 4-1BB se caracterizan por unirse al 4-1BB humano (SEQ ID N.º:9) con alta afinidad y actividad agonística. En una realización, el agonista 4-1BB es una molécula de unión que se une al 4-1BB humano (SEQ ID N.º:9). En una realización, el agonista 4-1BB es una molécula de unión que se une al 4-1BB murino (SEQ ID N.º:10). Las secuencias de aminoácidos del antígeno 4-1BB a las que se une un agonista 4-1BB o una molécula de unión se resumen en la Tabla 22.

TABLA 22: Secuencias de aminoácidos de los antígenos 4-1BB.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:9 humano 4-1BB, Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 9 (Homo sapiens)	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 N.º:10 murino 4-1BB, Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 9 (Mus musculus)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCRSCPPS HFSSISQPCN	60
	PHTVTVSGSA TSPRPPGSST AHAECEEDRE PELHFTGQCR CKECIPGYQQ VRQGCKKCG	120
	LGTPSQNGYG VCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT IGVTPESQPG	180
	GHGLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS	240
	CRCPQEEEGG GGYEL	256

[0782] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista 4-1BB que se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 100 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 90 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 80 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 70 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 60 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 50 pM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 40 pM o inferior,

o se une al 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 30 pM o inferior.

[0783] En algunas realizaciones, las composiciones, los procesos y los métodos descritos incluyen un agonista 4-1BB que se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 7,5 × 10^5 l/M-s o más rápido, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 7,5 × 10^5 l/M-s o más rápido, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 8 × 10^5 l/M-s o más rápido, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 8,5 × 10^5 l/M-s o más rápido, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 9 × 10^5 1/M-s o más rápido, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 9,5 × 10^5 l/M-s o más rápido, o se une al 4-1BB humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 1 × 10^6 1/M-s o más rápido.

[0784] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista 4-1BB que se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2,1 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2,2 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2,3 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2..4 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2,5 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2,6 × 10^{-5} 1/s o más lento o se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2,7 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2,8 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 2,9 × 10^{-5} 1/s o más lento, o se une al 4-1BB humano o murino con un k_{dissoc} de aproximadamente 3 × 10^{-5} 1/s o más lento.

[0785] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista 4-1BB que se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o inferior, se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o inferior, o se une al 4-1BB humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o inferior.

[0786] En una realización preferida, el agonista 4-1BB es utomilumab, también conocido como PF-05082566 o MOR-7480, o un fragmento, derivado, variante, o biosimilar del mismo. Utomilumab está disponible en Pfizer, Inc. Utomilumab es un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G2-lambda, anti-[*Homo sapiens* TNFRSF9 (miembro 9 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), 4-1BB, antígeno de células T ILA, CD137)], *Homo sapiens* (totalmente humano). Las secuencias de aminoácidos de utomilumab se exponen en la Tabla 7. Utomilumab comprende sitios de glicosilación en Asn59 y Asn292; puentes disulfuro intracadena pesada en las posiciones 22-96 (V_H-V_L), 143-199 (C_H1-C_L), 256-316 (C_H2) y 362-420 (C_H3); puentes disulfuro intracadena ligera en las posiciones 22'-87' (V_H-V_L) y 136'-195' (C_H1-C_L); puentes disulfuro cadena pesada-cadena pesada intercadena en las posiciones 218-218, 219-219, 222-222 y 225-225 de la isoforma IgG2A, en las posiciones 218-130, 219-219, 222-222 y 225-225 de la isoforma IgG2/B y en las posiciones 219-130 (2), 222-222 y 225-225 de la isoforma IgG2B; y puentes disulfuro entre cadenas pesadas y cadenas ligeras en las posiciones 130-213' (2) de la isoforma IgG2A, en las posiciones 218-213' y 130-213' de la isoforma IgG2A/B, y en las posiciones 218-213' (2) de la isoforma IgG2B. La preparación y propiedades de utomilumab y sus variantes y fragmentos se describen en Patentes de EE.UU. N.º 8.821.867; 8.337.850; y 9.468.678, y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2012/032433 A1. Las características preclínicas de utomilumab se describen en Fisher, et al., Cancer Immunolog. & Immunother. 2012, 61, 1721-33. Entre los ensayos clínicos actuales de utomilumab en diversas indicaciones hematológicas y de tumores sólidos se incluyen Identificadores de clinicaltrials.gov de los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU. NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066, y NCT02554812.

[0787] En una realización, un agonista 4-1BB comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º: 11 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º: 12. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º: 11 y SEQ ID N.º: 12, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes o conjugados de los mismos. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:11 y SEQ ID N.º:12, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:11 y SEQ ID N.º:12, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:11 y SEQ ID N.º: 12, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º: 11 y SEQ ID N.º:12, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:11 y SEQ ID N.º:12, respectivamente.

[0788] En una realización, el agonista 4-1BB comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o regiones variables (VRs) de utomilumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista 4-1BB comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º: 13, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista 4-1BB comprende la

secuencia mostrada en SEQ ID N.º: 14, y sus sustituciones conservadoras de aminoácidos. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º: 13 y SEQ ID N.º: 14, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º: 13 y SEQ ID N.º: 14, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:13 y SEQ ID N.º:14, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º: 13 y SEQ ID N.º: 14, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º: 13 y SEQ ID N.º:14, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende un anticuerpo scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:13 y SEQ ID N.º: 14.

[0789] En una realización, un agonista 4-1BB comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º: 15, SEQ ID N.º: 16, y SEQ ID N.º: 17, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera con las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:18, SEQ ID N.º:19, y SEQ ID N.º:20, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0790] **En** una realización, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista 4-1BB aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia al utomilumab. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo 4-1BB que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo,* 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento o producto biológico de referencia, donde el medicamento o producto biológico de referencia es utomilumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista 4-1BB autorizado o presentado para autorización, en el que el anticuerpo agonista 4-1BB se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es utomilumab. El anticuerpo agonista 4-1BB puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es utomilumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es utomilumab.

TABLA 23: Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos agonistas 4-1BB relacionados con utomilumab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:11 cadena pesada para utomilumab	[illegible]	
SEQ ID N.º:12 cadena ligera para utomilumab	[illegible]	
SEQ ID N.º:13 región variable de la cadena pesada de utomilumab	[illegible]	
SEQ ID N.º:14 región variable de cadena ligera para utomilumab	[illegible]	
SEQ ID N.º:15 cadena pesada CDR1 para utomilumab	STYWIS	6
SEQ ID N.º:16 cadena pesada CDR2 para utomilumab	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID N.º:17 cadena pesada CDR3 para utomilumab	RGYGIFDY	8

(continuación)

SEQ ID N.º:18 cadena ligera CDR1 para utomilumab	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID N.º:19 cadena ligera CDR2 para utomilumab	QDKNRPS	7
SEQ ID N.º:20 cadena ligera CDR3 para utomilumab	ATYTGFGSLA V	11

[0791] En una realización preferida, el agonista 4-1BB es el anticuerpo monoclonal urelumab, también conocido como BMS-663513 y 20H4.9.h4a, o un fragmento, derivado, variante o biosimilar del mismo. Urelumab está disponible en Bristol-Myers Squibb, Inc. y Creative Biolabs, Inc. Urelumab es un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G4-kappa, anti-[*Homo sapiens* TNFRSF9 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, 4-1BB, T cell antigen ILA, CD137)], *Homo sapiens* (totalmente humano). Las secuencias de aminoácidos de urelumab se exponen en la Tabla EE. Urelumab comprende sitios de N-glicosilación en las posiciones 298 (y 298''); puentes disulfuro intracadena de cadena pesada en las posiciones 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 262-322 (C_H2) y 368-426 (C_H3) (y en las posiciones 22''-95'', 148''-204'', 262''-322'' y 368''-426''); puentes disulfuro intracadena ligera en las posiciones 23'-88' (V_H-V_L) y 136'-196' (C_H1-C_L) (y en las posiciones 23'''-88''' y 136'''-196'''); puentes disulfuro cadena pesada-cadena pesada intercadena en las posiciones 227-227'' y 230-230''; y puentes disulfuro cadena pesada-cadena ligera intercadena en 135-216' y 135''-216'''. La preparación y las propiedades de urelumab y sus variantes y fragmentos se describen en Patentes de EE.UU. N.º 7,288,638 y 8,962,804. Las características preclínicas y clínicas de urelumab se describen en Segal, et al., Clin. Cancer Res. 2016, disponible en http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-16-1272. Entre los ensayos clínicos actuales de urelumab en diversas indicaciones hematológicas y de tumores sólidos se incluyen Identificadores de clinicaltrials.gov de los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU. NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 y NCT01471210.

[0792] En una realización, un agonista 4-1BB comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:21 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:22. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:21 y SEQ ID N.º:22, respectivamente.

[0793] En una realización, el agonista 4-1BB comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de urelumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada del agonista 4-1BB (V_H) comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:23, y la región variable de la cadena ligera del agonista 4-1BB (V_L) comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:24, y sustituciones aminoacídicas conservativas de la misma. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente. En una realización, un agonista 4-1BB comprende un anticuerpo scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24.

[0794] En una realización, un agonista 4-1BB comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:25, SEQ ID N.º:26, y SEQ ID N.º:27, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:28, SEQ ID N.º:29, y SEQ ID N.º:30, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0795] En una realización, el agonista 4-1BB es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista 4-1BB aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a urelumab. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo 4-1BB que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, por ejemplo, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento o producto biológico de referencia, donde el medicamento o producto biológico de referencia es urelumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista 4-1BB autorizado o presentado para autorización, en el que el anticuerpo agonista 4-1BB se

proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es urelumab. El anticuerpo agonista 4-1BB puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es urelumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es urelumab.

TABLA 24: Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos agonistas 4-1BB relacionados con urelumab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 21 cadena pesada para urelumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º 22 cadena ligera para urelumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º 23 cadena pesada variable para urelumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º 24 cadena ligera variable para urelumab	[illegible]	[illegible]
SEQ ID NO.º 25 cadena pesada CDR1 para urelumab	GYYWS	5
SEQ ID N.º 26 cadena pesada CDR2 para urelumab	EINHGGYVTY NPSLES	16
SEQ ID N.º 27 cadena pesada CDR3 para urelumab	DYGPGNYDWY FDL	13
SEQ ID N.º 28 cadena ligera CDR1 para urelumab	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID N.º 29 cadena ligera CDR2 para urelumab	DASNRAT	7
SEQ ID N.º 30 cadena ligera CDR3 para urelumab	QQRSDWPPAL T	11

[0796] **En** una realización, el agonista 4-1BB se selecciona del grupo que consiste en 1D8, 3Elor, 4B4 (BioLegend 309809), H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532), BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX), 145501 (Leinco Technologies B591), el anticuerpo producido por la línea celular depositada como ATCC No. HB-11248 y divulgada en Patente de EE.UU. n.º 6.974.863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), anticuerpos divulgados en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2005/0095244, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. nº 7.288.638 (como 20H4.9-IgG1 (BMS-663031)), anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.887.673 (como 4E9 o BMS-554271), anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 7.214.493, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.303.121, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.569.997, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.905.685 (como 4E9 o BMS-554271), anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.362.325 (como 1D8 o BMS-469492; 3H3 o BMS-469497; o 3EI), anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.974.863 (como 53A2); anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.210.669 (como 1D8, 3B8 o 3EI), anticuerpos descritos en Patente de EE.UU. n.º 5.928.893, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. n.º 6.303.121, anticuerpos divulgados en Patente de EE.UU. N.º 6,569,997, anticuerpos divulgados en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2012/177788, WO 2015/119923, y WO 2010/042433, y sus fragmentos, derivados, conjugados, variantes, o biosimilares.

[0797] En una realización, el agonista 4-1BB es una proteína de fusión agonista 4-1BB descrita en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1, y WO 2010/078966 A1; Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. US 2011/0027218 A1, US 2015/0126709 A1, US 2011/0111494 A1, US 2015/0110734 A1, y US 2015/0126710 A1; y Patentes de EE.UU. N.º 9,359,420, 9,340,599, 8,921,519, y 8,450,460.

[0798] En una realización, el agonista 4-1BB es una proteína de fusión agonística 4-1BB como se representa en la Estructura I-A (proteína de fusión de fragmento Fc-anticuerpo C-terminal) o Estructura I-B (proteína de fusión de fragmento Fc-anticuerpo N-terminal), o un fragmento, derivado, conjugado, variante o biosimilar de la misma (véase, Figura 50). En las estructuras I-A y I-B, los cilindros se refieren a dominios individuales de unión a polipéptidos. Las estructuras I-A y I-B comprenden tres dominios de unión de TNFRSF unidos linealmente derivados de, por ejemplo, 4-1BBL (ligando 4-1BB,

ligando CD137 (CD137L) o miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral 9 (TNFSF9)) o un anticuerpo que se une a 4-1BB, que se pliegan para formar una proteína trivalente, que luego se une a una segunda proteína trivalente a través de IgG1-Fc (incluidos los dominios C_H3 y C_H2) que luego se utiliza para unir dos de las proteínas trivalentes a través de enlaces disulfuro (óvalos alargados pequeños), estabilizando la estructura y proporcionando un agonista capaz de reunir los dominios de señalización intracelular de los seis receptores y proteínas de señalización para formar un complejo de señalización. Los dominios de unión a TNFRSF denotados como cilindros pueden ser dominios scFv que comprenden, *por ejemplo*, una cadena V_H y una V_L conectadas por un enlazador que puede comprender residuos hidrofílicos y secuencias Gly y Ser para flexibilidad, así como Glu y Lys para solubilidad. Puede utilizarse cualquier diseño de dominio scFv, como los descritos en de Marco, Microbial Cell Factories, 2011, 10, 44; Ahmad, et al., Clin. & Dev. Immunol. 2012, 980250; Monnier, et al., Antibodies, 2013, 2, 193-208; o en referencias mencionadas en otras partes del presente documento. Las estructuras de proteínas de fusión de esta forma se describen en Patentes de EE.UU. N.º 9,359,420, 9,340,599, 8,921,519, y 8,450,460.

[0799] Las secuencias de aminoácidos para los otros dominios polipeptídicos de la estructura I-A se indican en la Tabla 9. El dominio Fc comprende preferentemente un dominio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID N.º:31) el dominio bisagra completo (aminoácidos 1-16 de SEQ ID N.º:31) o una porción del dominio bisagra (*por ejemplo,* aminoácidos 4-16 de SEQ ID N.º:31). Los enlazadores preferidos para conectar un anticuerpo Fc C-terminal pueden seleccionarse a partir de las formas de realización dadas en SEQ ID N.º:32 a SEQ ID N.º:41, incluyendo enlazadores adecuados para la fusión de polipéptidos adicionales.

TABLA 25: Secuencias de aminoácidos para proteínas de fusión agonistas TNFRSF, incluidas las proteínas de fusión agonistas 4-1BB, con diseño de proteína de fusión de fragmento Fc-anticuerpo C-terminal (estructura I-A).

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 31 Dominio Fc	[illegible]	60
	[illegible]	120
	[illegible]	180
	[illegible]	230
SEQ ID N.º:32 enlazador	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID N.º:33 enlazador	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID N.º:34 enlazador	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID N.º:35 enlazador	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID N.º:36 enlazador	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID N.º:37 enlazador	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID N.º:38 enlazador	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
SEQ ID N.º:39 enlazador	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
SEQ ID N.º:40 enlazador	GGPSSSGSGK THTCPPCPAP E	21
SEQ ID N.º:41 enlazador	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

[0800] Las secuencias de aminoácidos para los otros dominios polipeptídicos de la estructura I-B se indican en la Tabla 10. Si se fusiona un fragmento de anticuerpo Fc con el extremo N-terminal de una proteína de fusión TNRFSF como en la estructura I-B, la secuencia del módulo Fc es preferiblemente la que se muestra en SEQ ID N.º:42, y las secuencias enlazadoras se seleccionan preferiblemente de entre las realizaciones expuestas en SED ID N.º:43 a SEQ ID N.º:45.

TABLA 26: Secuencias de aminoácidos para proteínas de fusión agonistas TNFRSF, incluidas las proteínas de fusión agonistas 4-1BB, con diseño de proteína de fusión de fragmento Fc-anticuerpo N-terminal (estructura I-B).

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 42 Dominio Fc	METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
SEQ ID N.º:43 enlazador	SGSGSGSGSG S	11
SEQ ID N.º:44 enlazador	SSSSSSGSGS GS	12
SEQ ID N.º:45 enlazador	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

[0801] En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a 4-1BB seleccionados del grupo que consiste en una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de utomilumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de urelumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de utomilumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable seleccionadas entre las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables descritas en la Tabla 10, cualquier combinación de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de las anteriores, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, y biosimilares de las mismas.

[0802] En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que comprenden una secuencia 4-1BBL. En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que comprenden una secuencia según SEQ ID N.º:46. En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que comprenden una secuencia soluble 4-1BBL. En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que comprenden una secuencia según SEQ ID N.º:47.

[0803] En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:13 y SEQ ID N.º:14, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:23 y SEQ ID N.º:24, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista 4-1BB según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión 4-1BB que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias V_H y V_L dadas en la Tabla 11, en la que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador.

TABLA 27: Dominios polipeptídicos adicionales útiles como dominios de unión 4-1BB en proteínas de fusión o como anticuerpos agonistas 4-1BB scFv.

Identificador	Secuencia (Simbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA	60
	SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL	120
	TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA	180
	LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV	240
	TPEIPAGLPS PRSE	254
SEQ ID N.º:47 4-1BBL dominio soluble	LRQGPFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ	60
	LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL	120
	SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	168
SEQ ID N.º:48 cadena pesada variable para 4B4-1-1 versión 1	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY	60
	NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF YTARGFAYWG QGTLVTVS	118
SEQ ID N.º:49 cadena ligera variable para 4B4-1-1 versión 1	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS	60
	RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	107
SEQ ID N.º:50 cadena pesada variable para 4B4-1-1 versión 2	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY	60
	NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF YTARGFAYWG QGTLVTVSA	119
SEQ ID N.º:51 cadena ligera variable para 4B4-1-1 versión 2	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS	60
	RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	108
SEQ ID N.º:52 cadena pesada variable para H39E3-2	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP	60
	GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	120
SEQ ID N.º:53 cadena ligera variable para H39E3-2	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL DSGNQKNYL	60
	WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	110

[0804] **En** una realización, el agonista 4-1BB es un polipéptido de fusión de cadena única agonista 4-1BB que comprende (i) un primer dominio de unión 4-1BB soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de unión 4-1BB soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio de unión 4-1BB soluble, que comprende además un dominio adicional en el extremo N-terminal y/o C-terminal, y en el que el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc. En una realización, el agonista 4-1BB es un polipéptido de fusión de cadena única agonista 4-1BB que comprende (i) un primer dominio de unión 4-1BB soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de unión 4-1BB soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio de unión 4-1BB soluble, que comprende además un dominio adicional en el extremo N-terminal y/o C-terminal, en el que el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc, en el que cada uno de los dominios solubles 4-1BB carece de una región peduncular (que contribuye a la trimerización y proporciona una cierta distancia a la membrana celular, pero no forma parte del dominio de unión 4-1BB) y el primer y el segundo enlazador peptídico tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos.

[0805] **En** una realización, el agonista 4-1BB es un polipéptido de fusión de cadena simple agonista 4-1BB que comprende (i) un primer dominio de citocina de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de citocina de la superfamilia del TNF soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio soluble de citocina de la superfamilia TNF, en el que cada uno de los dominios solubles de citocina de la superfamilia TNF carece de una región peduncular y el primer y el segundo enlazador peptídico tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos, y donde cada dominio de citocina de la superfamilia TNF es un dominio de unión a 4-1BB.

[0806] **En** una realización, el agonista 4-1BB es un anticuerpo scFv agonista 4-1BB que comprende cualquiera de los dominios V_H anteriores unido a cualquiera de los dominios V_L anteriores.

[0807] **En** una realización, el agonista 4-1BB es el anticuerpo agonista 4-1BB de BPS Bioscience catálogo n.º 79097-2, disponible comercialmente en BPS Bioscience, San Diego, CA, EE.UU.. En una realización, el agonista 4-1BB es el anticuerpo agonista 4-1BB de Creative Biolabs n.º de catálogo. MOM-18179, disponible comercialmente en Creative Biolabs, Shirley, NY, EE.UU.

3. AGONISTAS OX40 (CD134)

[0808] En una realización, el agonista TNFRSF es un agonista OX40 (CD134). El agonista de OX40 puede ser cualquier

molécula de unión a OX40 conocida en la técnica. La molécula de unión a OX40 puede ser un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión capaz de unirse a OX40 humano o de mamífero. Los agonistas de OX40 o las moléculas de unión a OX40 pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isotipo (*por ejemplo,* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*por ejemplo,* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. El agonista de OX40 o la molécula de unión a OX40 puede tener una cadena pesada y una ligera. Tal como se utiliza en el presente documento, el término molécula de unión también incluye anticuerpos (incluidos anticuerpos de longitud completa), anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (*p. ej.*, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, y fragmentos de anticuerpos, *por ejemplo*, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores, y formas modificadas de anticuerpos, *por ejemplo*, moléculas scFv, que se unen a OX40. En una realización, el agonista OX40 es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo totalmente humano. En una realización, el agonista OX40 es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, los agonistas de OX40 para uso en los métodos y composiciones divulgados actualmente incluyen anticuerpos anti-OX40, anticuerpos humanos anti-OX40, anticuerpos de ratón anti-OX40, anticuerpos de mamífero anti-OX40, anticuerpos monoclonales anti-OX40, anticuerpos policlonales anti-OX40, anticuerpos quiméricos anti-OX40, adnectinas anti-OX40, anticuerpos de dominio anti-OX40, fragmentos anti-OX40 de cadena simple, fragmentos anti-OX40 de cadena pesada, fragmentos anti-OX40 de cadena ligera, proteínas de fusión anti-OX40, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, o biosimilares de los mismos. En una realización preferida, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal agonista, anti-OX40 humanizado o totalmente humano (*es decir*, un anticuerpo derivado de una única línea celular).

[0809] En una realización preferida, el agonista OX40 o la molécula de unión OX40 también puede ser una proteína de fusión. Las proteínas de fusión OX40 que comprenden un dominio Fc fusionado a OX40L se describen, por ejemplo, en Sadun, et al., J. Immunother. 2009, 182, 1481-89. En una realización preferida, un agonista multimérico de OX40, como un agonista trimérico o hexamérico de OX40 (con tres o seis dominios de unión a ligando), puede inducir una agrupación superior del receptor (OX40L) y la formación de complejos de señalización celular interna en comparación con un anticuerpo monoclonal agonista, que típicamente posee dos dominios de unión a ligando. Las proteínas de fusión triméricas (trivalentes) o hexaméricas (o hexavalentes) o mayores que comprenden tres dominios de unión a TNFRSF e IgG1-Fc y que opcionalmente unen además dos o más de estas proteínas de fusión se describen, *por ejemplo,* en Gieffers, et al., Mol.

[0810] Se sabe que los anticuerpos OX40 agonísticos y las proteínas de fusión inducen fuertes respuestas inmunitarias. Curti, et al., Cancer Res. 2013, 73, 7189-98. En una realización preferida, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión que se une específicamente al antígeno OX40 de manera suficiente para reducir la toxicidad. En algunas realizaciones, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal OX40 agonista o una proteína de fusión que anula la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo la citotoxicidad de células NK. En algunas realizaciones, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal OX40 agonista o una proteína de fusión que anula la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). En algunas realizaciones, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 o una proteína de fusión que anula la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En algunas realizaciones, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal OX40 agonista o una proteína de fusión que anula la funcionalidad de la región Fc.

[0811] En algunas realizaciones, los agonistas de OX40 se caracterizan por unirse a OX40 humano (SEQ ID N.º:54) con alta afinidad y actividad agonística. En una realización, el agonista de OX40 es una molécula de unión que se une a OX40 humano (SEQ ID N.º:54). En una realización, el agonista de OX40 es una molécula de unión que se une a OX40 murino (SEQ ID N.º:55). Las secuencias de aminoácidos del antígeno OX40 a las que se une un agonista OX40 o una molécula de unión se resumen en la Tabla 12.

TABLA 28: Secuencias de aminoácidos de los antígenos OX40.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:54 OX40 humano (Homo sapiens)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ	60
	NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK	120
	PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKRTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ	180
	GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL	240
	RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAK	277
SEQ ID N.º:55 OX40 murino (Mus musculus)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHRMVS RCDHTRDTLC	60
	HPCETGFYNE AVNYDTKKCK TCTQCNHRSS LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG	120
	VDCVPCPPGH FSPGDNQACK PWTNCTLAGK HTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP	180
	TFPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW	240
	RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	272

[0812] **En** algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 100 pM o inferior, se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 90 pM o inferior, se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 80 pM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una K_D de aproximadamente 70 pM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una K_D de aproximadamente 60 pM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una K_D de aproximadamente 50 pM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una K_D de aproximadamente 40 pM o inferior, o se une a la OX40 humana o murina con una K_D de aproximadamente 30 pM o inferior.

[0813] **En** algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 7,5 × 10^5 1/M-s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 7,5 ×10^5 1/M-s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 8 × 10^5 1/M-s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con un k_{assoc} de aproximadamente 8,5 × 10^5 1/M-s o más rápido, se une a la OX40 humana o murina con un k_{assoc} de aproximadamente 9 × 10^5 1/M-s o más rápido, se une a la OX40 humana o murina con un k_{assoc} de aproximadamente 9,5 × 10^5 1/M-s o más rápido, o se une a la OX40 humana o murina con un k_{assoc} de aproximadamente 1 × 10^6 1/M-s o más rápido.

[0814] **En** algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,1 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,2 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,3 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,4 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a OX40 humano o murino El OX40 murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,5 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,6 × 10^{-5} 1/s o más lento o se une al OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,7 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,8 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une al OX40 humano o murino con una kdissoc de aproximadamente 2,9 × 10^{-5} 1/s o más lento, o se une al OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 3 × 10^{-5} 1/s o más lento.

[0815] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o inferior, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o inferior, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o inferior, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o inferior, se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o inferior, o se une a la OX40 humana o murina con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o inferior.

[0816] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es tavolixizumab, también conocido como MEDI0562 o MEDI-0562. Tavolixizumab está disponible en la filial MedImmune de AstraZeneca, Inc. Tavolixizumab es una inmunoglobulina G1-kappa, *anti-[Homo sapiens* TNFRSF4 (receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) superfamilia miembro 4, OX40, CD134)], anticuerpo monoclonal humanizado y quimérico. Las secuencias de aminoácidos del tavolixizumab se exponen en la Tabla 13. El tavolixizumab comprende sitios de N-glicosilación en las posiciones 301 y 301", con glicanos complejos bi-antenarios fucosilados de tipo CHO; puentes disulfuro intracadena de cadena pesada en las posiciones 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 265-325 (C_H2) y 371-429 (C_H3) (y en las posiciones 22"-95", 148"-204", 265"-325", y 371"-429"); puentes disulfuro intracadena ligera en las posiciones 23'-88' (V_H-V_L) y 134'-194' (C_L1-C_L) (y en las posiciones 23'"-88'" y 134'"-194'"); puentes disulfuro cadena pesada-cadena pesada intercadena en las posiciones 230-230" y 233-233"; y puentes disulfuro cadena pesada-cadena ligera intercadena en las posiciones 224-214' y 224"-214'". Entre los ensayos

clínicos actuales de tavolixizumab en diversas indicaciones de tumores sólidos se incluyen los de Identificadores NCT02318394 y NCT02705482 de clinicaltrials.gov de los Institutos Nacionales de Salud. de EE.UU..

[0817] **En** una realización, un agonista OX40 comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:56 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:57. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes o conjugados de los mismos. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:56 y SEQ ID N.º:57, respectivamente.

[0818] En una realización, el agonista OX40 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de tavolixizumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:58, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:59, y sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una idéntica en al menos un 99% a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una idéntica en al menos un 98% a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende un anticuerpo scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias que se muestran en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59.

[0819] En una realización, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:60, SEQ ID N.º:61, y SEQ ID N.º:62, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:63, SEQ ID N.º:64, y SEQ ID N.º:65, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0820] **En** una realización, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia al tavolixizumab. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo*, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es tavolixizumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista OX40 autorizado o presentado para autorización, donde el anticuerpo agonista OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es tavolixizumab. El anticuerpo agonista OX40 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es tavolixizumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es tavolixizumab.

TABLA 29: Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos agonistas OX40 relacionados con tavolixizumab.

Identificador	Secuencia (Simbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:56 cadena pesada para tavolixizumab	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKP PGKGLEYIGY IYYNGITYYN	6
	PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS	13
	SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS	18
	SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG	24
	GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY	30
	NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE	36
	EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR	42
	WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	45
SEQ ID N.º:57 cadena ligera para tavolixizumab	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS	6
	RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GQALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP	12
	SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT	18
	LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	21
SEQ ID N.º:58 región variable de la cadena pesada de tavolixizumab	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKP PGKGLEYIGY IYYNGITYYN	6
	PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT	11
SEQ ID N.º:59 región variable de cadena ligera para tavolixizumab	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS	6
	RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GQALPWTFGQ GTKVEIKR	10
SEQ ID N.º:60 cadena pesada CDR1 para tavolixizumab	GSFSSGYWN	9
SEQ ID N.º:61 cadena pesada CDR2 para tavolixizumab	YIGYISYNGI TYH	13
SEQ ID N.º:62 cadena pesada CDR3 para tavolixizumab	RYKYDYDGGH AMDY	14
SEQ ID N.º:63 cadena ligera CDR1 para tavolixizumab	QDISNYLN	8
SEQ ID N.º:64 cadena ligera CDR2 para tavolixizumab	LLIYYTSKLH S	11
SEQ ID N.º:65 cadena ligera CDR3 para tavolixizumab	QQGSALPW	8

[0821] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es 11D4, que es un anticuerpo totalmente humano disponible en Pfizer, Inc. La preparación y las propiedades del 11D4 se describen en Patentes de EE.UU. N.º 7,960,515; 8,236,930; y 9,028,824. Las secuencias de aminoácidos de 11D4 se exponen en la Tabla 14.

[0822] **En** una realización, un agonista OX40 comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:66 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:67. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas

en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:66 y SEQ ID N.º:67, respectivamente.

[0823] En una realización, el agonista OX40 comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o regiones variables (VRs) de 11D4. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:68, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:69, y sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una idéntica en al menos un 98% a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente.

[0824] En una realización, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:70, SEQ ID N.º:71, y SEQ ID N.º:72, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:73, SEQ ID N.º:74, y SEQ ID N.º:75, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0825] En una realización, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a 11D4. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo*, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 11D4. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista OX40 autorizado o presentado para autorización, donde el anticuerpo agonista OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 11D4. El anticuerpo agonista OX40 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 11D4. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 11D4.

TABLA 30: Secuencias de aminoácidos para anticuerpos agonistas OX40 relacionados con 11D4.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:66 cadena pesada para 11D4	[illegible]	
SEQ ID N.º:67 cadena ligera para 11D4	[illegible]	
SEQ ID N.º:68 región variable de la cadena pesada para 11D4	[illegible]	
SEQ ID N.º:69 región variable de la cadena ligera para 11D4	[illegible]	
SEQ ID N.º:70 cadena pesada CDR1 para 11D4	SYSMN	5
SEQ ID N.º:71 cadena pesada CDR2 para 11D4	YISSSSSTID YADSVKG	17
SEQ ID N.º:72 cadena pesada CDR3 para 11D4	ESGWYLFDY	9
SEQ ID N.º:73 cadena ligera CDR1 para 11D4	RASQGISSWL A	11
SEQ ID N.º:74 cadena ligera CDR2 para 11D4	AASSLQS	7
SEQ ID N.º:75 cadena ligera CDR3 para 11D4	QQYNSYPPT	9

[0826] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es 18D8, que es un anticuerpo totalmente humano disponible en Pfizer, Inc. La preparación y las propiedades del 18D8 se describen en Patentes de EE.UU. N.º 7,960,515; 8,236,930; y 9,028,824. Las secuencias de aminoácidos de 18D8 se exponen en la Tabla 15.

[0827] **En** una realización, un agonista OX40 comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:76 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:77. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:76 y SEQ ID N.º:77, respectivamente.

[0828] En una realización, el agonista OX40 comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o regiones variables (VRs) de 18D8. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:78, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:79, y sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente. En una realización, unagonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una idéntica en al menos un 98% a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente.

[0829] En una realización, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:80, SEQ ID N.º:81, y SEQ ID N.º:82, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:83, SEQ ID N.º:84, y SEQ ID N.º:85, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0830] En una realización, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista de OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a 18D8. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar

comprende un anticuerpo OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo*, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 18D8. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista OX40 autorizado o presentado para autorización, donde el anticuerpo agonista OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 18D8. El anticuerpo agonista OX40 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 18D8. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es 18D8.

TABLA 31: Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos agonistas OX40 relacionados con 18D8.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:76 cadena pesada para 18D8	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:77 cadena ligera para 18D8	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:78 región variable de la cadena pesada para 18D8	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:79 región variable de la cadena ligera para 18D8	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:80 cadena pesada CDR1 para 18D8	DYAMH	5
SEQ ID N.º:81 cadena pesada CDR2 para 18D8	GISWNSGSIG YADSVKG	17
SEQ ID N.º:82 cadena pesada CDR3 para 18D8	DQSTADYYFY YGMDV	15
SEQ ID N.º:83 cadena ligera CDR1 para 18D8	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID N.º:84 cadena ligera CDR2 para 18D8	DASNRAT	7
SEQ ID N.º:85 cadena ligera CDR3 para 18D8	QQRSNWPT	8

[0831] **En** algunas realizaciones, el agonista OX40 es Hu119-122, que es un anticuerpo humanizado disponible de GlaxoSmithKline plc. La preparación y las propiedades de Hu119-122 se describen en Patentes de EE.UU. N.º 9.006.399 y 9.163.085, y en la Publicación Internacional de Patentes n.º WO 2012/027328. Las secuencias de aminoácidos de Hu119-122 se exponen en la Tabla 16.

[0832] En una realización, el agonista OX40 comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o regiones variables (VRs) de Hu119-122. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:86, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:87, y sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una idéntica en al menos un 98% a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente.

[0833] En una realización, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen

las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:88, SEQ ID N.º:89, y SEQ ID N.º:90, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:91, SEQ ID N.º:92, y SEQ ID N.º:93, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas.

[0834] En una realización, el agonista OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a Hu119-122. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, por ejemplo, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu119-122. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista OX40 autorizado o presentado para autorización, donde el anticuerpo agonista OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu119-122. El anticuerpo agonista OX40 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu119-122. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu119-122.

TABLA 32: Secuencias de aminoácidos para anticuerpos agonistas OX40 relacionados con Hu119-122.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:86 región variable de la cadena pesada para Hu119-122	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:87 región variable de la cadena ligera para Hu119-122	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:88 cadena pesada CDR1 para Hu119-122	SHDMS	5
SEQ ID N.º:89 cadena pesada CDR2 para Hu119-122	AINSDGGSTY YPDTMER	17
SEQ ID N.º:90 cadena pesada CDR3 para Hu119-122	HYDDYYAWFA Y	11
SEQ ID N.º:91 cadena ligera CDR1 para Hu119-122	RASKSVSTSG YSYMH	15
SEQ ID N.º:92 cadena ligera CDR2 para Hu119-122	LASNLES	7
SEQ ID N.º:93 cadena ligera CDR3 para Hu119-122	QHSRELPLT	9

[0835] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es Hu106-222, que es un anticuerpo humanizado disponible de GlaxoSmithKline plc. La preparación y las propiedades de Hu106-222 se describen en Patentes de EE.UU. N.º 9.006.399 y 9.163.085, y en la Publicación Internacional de Patentes n.º WO 2012/027328. Las secuencias de aminoácidos de Hu106-222 se exponen en la Tabla 17.

[0836] En una realización, el agonista OX40 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de Hu106-222. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:94, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del agonista de OX40 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:95, y sustituciones de aminoácidos conservadoras de la misma. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente. En una realización, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente.

[0837] En una realización, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:96, SEQ ID N.º:97, y SEQ ID N.º:98, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:99, SEQ ID N.º: 100, y SEQ ID N.º:101, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de los mismos.

[0838] **En** una realización, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista de OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a Hu106-222. En una realización, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo*, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu106-222. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo agonista OX40 autorizado o presentado para autorización, donde el anticuerpo agonista OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu106-222. El anticuerpo agonista OX40 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu106-222. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es Hu106-222.

TABLA 33: Secuencias de aminoácidos para anticuerpos agonistas OX40 relacionados con Hu106-222.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:94 región variable de la cadena pesada para Hu106-222	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:95 región variable de la cadena ligera para Hu106-222	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º:96 cadena pesada CDR1 para Hu106-222	DYSMH	5
SEQ ID N.º:97 cadena pesada CDR2 para Hu106-222	WINTETGEPT YADDFKG	17
SEQ ID N.º:98 cadena pesada CDR3 para Hu106-222	PYYDYVSYYA MDY	13
SEQ ID N.º:99 cadena ligera CDR1 para Hu106-222	KASQDVSTAV A	11
SEQ ID N.º:100 cadena ligera CDR2 para Hu106-222	SASYLYT	7
SEQ ID N.º:101 cadena ligera CDR3 para Hu106-222	QQHYSTPRT	9

[0839] En algunas realizaciones, el anticuerpo agonista OX40 es MEDI6469 (también denominado 9B12). MEDI6469 es un anticuerpo monoclonal murino. Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575-585. En algunas realizaciones el agonista OX40 es un anticuerpo producido por el hibridoma 9B12, depositado en Biovest Inc. (Malvern, MA, EE.UU.), como se describe en Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575-585. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias CDR de MEDI6469. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera de MEDI6469.

[0840] En una realización, el agonista OX40 es L106 BD (Pharmingen Producto #340420). En algunas realizaciones, el agonista OX40 comprende las CDR del anticuerpo L106 (BD Pharmingen Producto #340420). En algunas realizaciones, el agonista OX40 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo L106 (BD Pharmingen Producto #340420). En una realización, el agonista OX40 es ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo #20073). En algunas realizaciones, el agonista OX40 comprende las CDR del anticuerpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo #20073). En algunas realizaciones, el agonista OX40 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo #20073). En una realización, el agonista OX40 es el anticuerpo monoclonal

murino anti-mCD134/mOX40 (clon OX86), disponible comercialmente en InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NH.

[0841] En una realización, el agonista OX40 se selecciona de entre los agonistas OX40 descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 95/12673, WO 95/21925, WO 2006/121810, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/038191, y WO 2014/148895; Solicitud de Patente Europea EP 0672141; Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 y US 2015/132288 (incluidos los clones 20E5 y 12H3); y Patentes de EE.UU. N.º 7,504,101, 7,550,140, 7,622,444, 7,696,175, 7,960,515, 7,961,515, 8,133,983, 9,006,399, y 9,163,085.

[0842] En una realización, el agonista OX40 es una proteína de fusión agonista OX40 como se representa en la Estructura I-A (proteína de fusión fragmento Fc-anticuerpo C-terminal) o Estructura I-B (proteína de fusión fragmento Fc-anticuerpo N-terminal), o un fragmento, derivado, conjugado, variante, o biosimilar de la misma. Las propiedades de las estructuras I-A e I-B se describen anteriormente y en Patentes de EE.UU. N.º 9,359,420, 9,340,599, 8,921,519, y 8,450,460. Las secuencias de aminoácidos de los dominios polipeptídicos de la estructura I-A figuran en la Tabla 9. El dominio Fc comprende preferentemente un dominio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID N.º:31) el dominio bisagra completo (aminoácidos 1-16 de SEQ ID N.º:31) o una porción del dominio bisagra (*por ejemplo*, aminoácidos 4-16 de SEQ ID N.º:31). Los enlazadores preferidos para conectar un anticuerpo Fc C-terminal pueden seleccionarse a partir de las formas de realización dadas en SEQ ID N.º:32 a SEQ ID N.º:41, incluyendo enlazadores adecuados para la fusión de polipéptidos adicionales. Asimismo, las secuencias de aminoácidos de los dominios polipeptídicos de la estructura I-B se indican en la Tabla 10. Si se fusiona un fragmento de anticuerpo Fc con el extremo N-terminal de una proteína de fusión TNRFSF como en la estructura I-B, la secuencia del módulo Fc es preferiblemente la que se muestra en SEQ ID N.º:42, y las secuencias enlazadoras se seleccionan preferiblemente de entre las realizaciones expuestas en SED ID N.º:43 a SEQ ID N.º:45.

[0843] En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión de OX40 seleccionados del grupo que consiste en una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de tavolixizumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de 11D4, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de 18D8, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de Hu119-122, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de Hu106-222, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable seleccionadas de las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables descritas en la Tabla 17, cualquier combinación de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de las anteriores, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, y biosimilares de las mismas.

[0844] En una realización, una proteína de fusión agonista OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión OX40 que comprenden una secuencia OX40L. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que comprenden una secuencia según SEQ ID N.º:102. En una realización, una proteína de fusión agonista OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión OX40 que comprenden una secuencia OX40L soluble. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que comprenden una secuencia según SEQ ID N.º:103. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que comprenden una secuencia según SEQ ID N.º:104.

[0845] En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:58 y SEQ ID N.º:59, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:68 y SEQ ID N.º:69, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:78 y SEQ ID N.º:79, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:86 y SEQ ID N.º:87, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:94 y SEQ ID N.º:95, respectivamente, en las que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una realización, una proteína de fusión agonista de OX40 según las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias V_H y V_L dadas en la Tabla 14, en la que los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador.

TABLA 34: Dominios polipeptídicos adicionales útiles como dominios de unión a OX40 en proteínas de fusión (*por ejemplo*, estructuras I-A y I-B) o como anticuerpos agonistas de OX40 scFv.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ	60
	SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ	120
	KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF	180
	CVL	183
SEQ ID N.º:103 OX40L dominio soluble	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE	60
	VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL	120
	IHQNPGEFCV L	131
SEQ ID N.º:104 OX40L dominio soluble (alternativo)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI	60
	SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ	120
	NPGEFCVL	128
SEQ ID N.º:105 cadena pesada variable para 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY	60
	ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVNYALDY WGQGTLVTVS	120
SEQ ID N.º:106 cadena ligera variable para 008	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA	60
	SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	108
SEQ ID N.º:107 cadena pesada variable para 011	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMHWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD	60
	SREGRFTISR DNSKNTLYLQ MNSLRAEDTA VYYCARDRYF RQGNAFDYWG QGTLVTVSSA	120
SEQ ID N.º:108 cadena ligera variable para 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA	60
	SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	108
SEQ ID N.º:109 cadena pesada variable para 021	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY	60
	ADSVKGRFTI SRDNSFNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLFNALDY WGQGTLVTVS	120
SEQ ID N.º:110 cadena ligera variable para 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA	60
	SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKNHP FTFGQGTK	108
SEQ ID N.º:111 cadena pesada variable para 023	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA	60
	DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW QQGTLVTVSS	120
SEQ ID N.º:112 cadena ligera variable para 023	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA	60
	RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPRAFGQ GTKVEIKR	108
SEQ ID N.º:113 región variable de la cadena pesada	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY	60
	NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS	119
SEQ ID N.º:114 región variable de la cadena ligera	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLRSGVPS	60
	RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	108
SEQ ID N.º:115 región variable de la cadena pesada	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGTTY	60
	NQNFKDKATL TVDKSSGTAY MEFRSLTSED SAVYYCARNG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS	120
	S	121
SEQ ID N.º:116 región variable de la cadena ligera	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD	60
	RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGS GTKLEIKR	108
SEQ ID N.º:117 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCRASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGRPTY	60
	ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV	120
	SS	122
SEQ ID N.º:118 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGRPTY	60
	ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV	120
	SS	122
SEQ ID N.º:119 región variable de la cadena	DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD	60
	RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	107

(continuación)

ligera del anticuerpo humanizado	
SEQ ID N.º:120 región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID N.º:121 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	EVQLVESGGG LVQPGRSLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKNTLY LQMSSLRSED TALYYCARRY DDYYAMDYWG QGTSVTVSS 120
SEQ ID N.º:122 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARRY DDYYAMDYWG QGTMVTVSS 120
SEQ ID N.º:123 región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID N.º:124 región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGIDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID N.º:125 región variable de la cadena pesada	MELGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID N.º:126 región variable de la cadena ligera	MPPSIQFLGL LLFWLRGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIRY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[0846] En una realización, el agonista de OX40 es un polipéptido de fusión de cadena simple agonista de OX40 que comprende (i) un primer dominio soluble de unión a OX40, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio soluble de unión a OX40, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio soluble de unión a OX40, que comprende además un dominio adicional en el extremo N-terminal y/o C-terminal, y en el que el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc. En una realización, el agonista de OX40 es un polipéptido de fusión de cadena simple agonista de OX40 que comprende (i) un primer dominio soluble de unión a OX40, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio soluble de unión a OX40, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio soluble de unión a OX40, que comprende además un dominio adicional en el extremo N-terminal y/o C-terminal, en el que el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc en el que cada uno de los dominios solubles de unión a OX40 carece de una región peduncular (que contribuye a la trimerización y proporciona una cierta distancia a la membrana celular, pero no forma parte del dominio de unión a OX40) y el primer y el segundo enlazador peptídico tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos.

[0847] **En** una realización, el agonista de OX40 es un polipéptido de fusión de cadena simple agonista de OX40 que comprende (i) un primer dominio de citocina de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de citocina de la superfamilia del TNF soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico, y (v) un tercer dominio soluble de citocina de la superfamilia TNF, en el que cada uno de los dominios solubles de citocina de la superfamilia TNF carece de una región peduncular y el primer y el segundo enlazador peptídico tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos, y donde el dominio de citocina de la superfamilia TNF es un dominio de unión a OX40.

[0848] En algunas realizaciones, el agonista OX40 es MEDI6383. MEDI6383 es una proteína de fusión agonista de OX40 y puede prepararse como se describe en Patente de EE.UU. N.º 6,312,700.

[0849] En una realización, el agonista de OX40 es un anticuerpo scFv agonista de OX40 que comprende cualquiera de los dominios V_H anteriores unido a cualquiera de los dominios V_L anteriores.

[0850] **En** una realización, el agonista OX40 es el anticuerpo monoclonal agonista OX40 de Creative Biolabs MOM-18455, disponible comercialmente de Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, USA.

[0851] **En** una realización, el agonista OX40 es el anticuerpo agonista OX40 clon Ber-ACT35 comercialmente disponible

de BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA.

I. Análisis Opcionales de Viabilidad Celular

[0852] Opcionalmente, se puede realizar un ensayo de viabilidad celular después de la primera expansión de cebado (a veces denominada expansión inicial a granel), utilizando ensayos estándar conocidos en la técnica. Así, en ciertas realizaciones, el método comprende la realización de un ensayo de viabilidad celular posterior a la primera expansión de cebado. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de exclusión con azul tripán en una muestra de TIL, que marca selectivamente las células muertas y permite evaluar la viabilidad. Otros ensayos para comprobar la viabilidad pueden ser, entre otros, el ensayo del azul de Alamar; y el ensayo MTT.

1. Recuento de células, Viabilidad, Citometría de flujo

[0853] En algunas realizaciones, se miden los recuentos celulares y/o la viabilidad. La expresión de marcadores tales como, entre otros, CD3, CD4, CD8, y CD56, así como cualquier otro divulgado o descrito en el presente documento, puede medirse mediante citometría de flujo con anticuerpos, por ejemplo, entre otros, los disponibles comercialmente en BD Bio-sciences (BD Biosciences, San Jose, CA) utilizando un citómetro de flujo FACSCanto™ (BD Biosciences). Las células pueden contarse manualmente utilizando un hemocitómetro desechable c-chip (VWR, Batavia, IL) y la viabilidad puede evaluarse utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, la tinción con azul tripán. La viabilidad celular también puede ensayarse basándose en USSN 15/863,634 (US2018-0282694). La viabilidad celular también puede ensayarse en base a la Publicación de patente de EE.UU. n.º 2018/0280436 o Publicación de patente internacional n.º WO/2018/081473.

[0854] En algunos casos, la población a granel de TIL puede ser criopreservada inmediatamente, usando los protocolos discutidos a continuación. Alternativamente, la población de TIL a granel puede someterse a REP y luego criopreservarse como se explica a continuación. Del mismo modo, en el caso de que los TIL modificados genéticamente vayan a utilizarse en terapia, las poblaciones de TIL a granel o REP pueden someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados.

2. Cultivos celulares

[0855] En una realización, un método para expandir TILs, incluyendo aquellos discutidos anteriormente así como ejemplificados en la Figura 8, en particular, por ejemplo, Figura 8B y/o Figura 8C, puede incluir el uso de aproximadamente 5,000 mL a aproximadamente 25,000 mL de medio celular, aproximadamente 5,000 mL a aproximadamente 10,000 mL de medio celular, o aproximadamente 5,800 mL a aproximadamente 8,700 mL de medio celular. En algunas realizaciones, el medio es un medio libre de suero. En algunas realizaciones, el medio de la primera expansión de cebado no contiene suero. En algunas realizaciones, el medio de la segunda expansión está libre de suero. En algunas realizaciones, los medios de la primera expansión de cebado y de la segunda expansión (también denominada segunda expansión rápida) no contienen suero. En una realización, la expansión del número de TILs no utiliza más de un tipo de medio de cultivo celular. Puede utilizarse cualquier medio de cultivo celular adecuado, *por ejemplo*, el medio de cultivo celular AIM-V (L-glutamina, 50 µM de sulfato de estreptomicina y 10 µM de sulfato de gentamicina (Invitrogen, Carlsbad CA). En este sentido, los métodos inventivos reducen ventajosamente la cantidad de medio y el número de tipos de medio necesarios para ampliar el número de TIL. En una realización, la expansión del número de TIL puede comprender la alimentación de las células con una frecuencia no superior a cada tercer o cuarto día. La ampliación del número de células en un contenedor permeable al gas simplifica los procedimientos necesarios para ampliar el número de células al reducir la frecuencia de alimentación necesaria para ampliar las células.

[0856] **En** una realización, el medio de cultivo celular en el primer y/o segundo contenedor permeable al gas no está filtrado. El uso de un medio celular no filtrado puede simplificar los procedimientos necesarios para ampliar el número de células. En una realización, el medio celular en el primer y/o segundo contenedor permeable al gas carece de beta-mercaptoetanol (BME).

[0857] En una realización, la duración del método comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células alimentadoras presentadoras de antígeno 1X, y OKT-3 durante una duración de aproximadamente 1 a 8 días, *p. ej.*, aproximadamente 7 días como una primera expansión de cebado, o aproximadamente 8 días como una primera expansión de cebado; transferir los TIL a un segundo recipiente permeable a los gases y expandir el número de TIL en el segundo recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células alimentadoras presentadoras de antígeno 2X, y OKT-3 durante una duración de aproximadamente 7 a 9 días, *p. ej.*, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, o aproximadamente 9 días.

[0858] En una realización, la duración del método comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células alimentadoras presentadoras de antígeno 1X, y OKT-3 durante una duración de aproximadamente 1 a 7 días, *por ejemplo*, aproximadamente 7 días como una primera expansión de cebado; transferir los TIL a un segundo recipiente permeable a los gases y expandir el número de TIL en el segundo recipiente permeable a los gases que contiene medio

celular que incluye IL-2, células alimentadoras presentadoras de antígeno 2X, y OKT-3 durante una duración de aproximadamente 7 a 9 días, *por ejemplo*, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, o aproximadamente 9 días.

[0859] En una realización, la duración del método comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células alimentadoras presentadoras de antígeno 1X, y OKT-3 durante una duración de aproximadamente 1 a 7 días, *por ejemplo*, aproximadamente 7 días como una primera expansión de cebado; transferir los TIL a un segundo recipiente permeable a los gases y expandir el número de TIL en el segundo recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células alimentadoras presentadoras de antígeno 2X, y OKT-3 durante una duración de aproximadamente 7 a 10 días, por ejemplo, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, o aproximadamente 10 días.

[0860] **En** una realización, los TIL se expanden en recipientes permeables al gas. Se han utilizado contenedores permeables al gas para expandir TILs utilizando PBMCs mediante métodos, composiciones, y dispositivos conocidos en la técnica, incluidos los descritos en Publicación de solicitud de patente de EE. UU n.º 2005/0106717 A1. En una realización, los TIL se expanden en bolsas permeables al gas. En una realización, los TIL se expanden utilizando un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables al gas, como el Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). En una realización, los TIL se expanden utilizando un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables al gas, como el WAVE Bioreactor System, también conocido como Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). En una realización, el sistema de expansión celular incluye una bolsa celular permeable al gas con un volumen seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente aproximadamente 100 ml, aproximadamente 200 ml, aproximadamente 300 ml, aproximadamente 400 ml, aproximadamente 500 ml, aproximadamente 600 ml, aproximadamente 700 ml, aproximadamente 800 ml, aproximadamente 900 ml, aproximadamente 1 l, aproximadamente 2 l, aproximadamente 3 l, aproximadamente 4 l, aproximadamente 5 l, aproximadamente 6 l, aproximadamente 7 l, aproximadamente 8 l, aproximadamente 9 l, y aproximadamente 10 l.

[0861] En una realización, los TIL pueden expandirse en matraces G-Rex (disponibles comercialmente en Wilson Wolf Manufacturing). Tales realizaciones permiten que las poblaciones celulares se expandan desde aproximadamente 5×10^5 células/cm^2 hasta entre 10×10^6 y 30×10^6 células/cm^2. En una realización esto es sin alimentación. En una realización, esto es sin alimentación mientras el medio resida a una altura de unos 10 cm en el matraz G-Rex. En una realización, esto es sin alimentación pero con la adición de una o más citoquinas. En una realización, la citoquina puede añadirse como un bolo sin necesidad de mezclar la citoquina con el medio. Dichos recipientes, dispositivos y métodos son conocidos en la técnica y se han utilizado para expandir TILs, e incluyen los descritos en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2014/0377739A1, publicación internacional n.º WO 2014/210036 A1, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º us 2013/0115617 A1, publicación internacional n.º WO 2013/188427 A1, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2011/0136228 A1, Patente de EE.UU. n.º US 8,809,050 B2, Publicación internacional n.º WO 2011/072088 A2, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2016/0208216 A1, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2012/0244133 A1, Publicación internacional n.º WO 2012/129201 A1, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2013/0102075 A1, Patente de EE.UU. n.º US 8,956,860 B2, Publicación internacional n.º WO 2013/173835 A1, Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2015/0175966 A1. Tales procesos también se describen en Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292.

J. Ingeniería Genética Opcional de TIL

[0862] En algunas realizaciones, los TIL expandidos de la presente invención se manipulan adicionalmente antes, durante o después de una etapa de expansión, incluso durante procesos de fabricación cerrados y estériles, cada uno como se proporciona en el presente documento, con el fin de alterar la expresión de proteínas de manera transitoria. En algunas realizaciones, la expresión proteica transitoriamente alterada se debe a la edición transitoria de genes. En algunas realizaciones, los TIL expandidos de la presente invención se tratan con factores de transcripción (TF) y/u otras moléculas capaces de alterar transitoriamente la expresión de proteínas en los TIL. En algunas realizaciones, los TF y/u otras moléculas que son capaces de alterar transitoriamente la expresión de proteínas proporcionan una expresión alterada de antígenos tumorales y/o una alteración en el número de células T específicas de antígeno tumoral en una población de TILs.

[0863] En ciertas realizaciones, el método comprende editar genéticamente una población de TILs. En ciertas realizaciones, el método comprende editar genéticamente la primera población de TILs, la segunda población de TILs y/o la tercera población de TILs.

[0864] En algunas realizaciones, la presente invención incluye la edición genética a través de la inserción de nucleótidos, tal como a través de la inserción de ácido ribonucleico (ARN), incluyendo la inserción de ARN mensajero (ARNm) o ARN interferente pequeño (o corto) (siARN), en una población de TILs para la promoción de la expresión de una o más proteínas o la inhibición de la expresión de una o más proteínas, así como combinaciones simultáneas de la promoción de un conjunto de proteínas con la inhibición de otro conjunto de proteínas.

[0865] En algunas realizaciones, los TIL expandidos de la presente invención sufren una alteración transitoria de la expresión proteica. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de la proteína se produce en la

población de TIL a granel antes de la primera expansión, incluyendo, por ejemplo en la población de TIL obtenida de, por ejemplo, la Etapa A como se indica en la Figura 8 (en particular la Figura 8B y/o la Figura 8C). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se produce durante la primera expansión, incluyendo, por ejemplo en la población de TIL expandida en, por ejemplo, la Etapa B como se indica en la Figura 8 (por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se produce después de la primera expansión, incluyendo, por ejemplo en la población de TIL en transición entre la primera y la segunda expansión (por ejemplo, la segunda población de TIL como se describe en el presente documento), la población de TIL obtenida de, por ejemplo, la etapa B e incluida en la etapa C como se indica en la Figura 8. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de la proteína se produce en la población de TIL a granel antes de la segunda expansión, incluyendo, por ejemplo en la población de TIL obtenida de, por ejemplo, la Etapa C y antes de su expansión en la Etapa D como se indica en la Figura 8. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se produce durante la segunda expansión, incluyendo, por ejemplo en la población de TIL expandida en, por ejemplo, la Etapa D como se indica en la Figura 8 (por ejemplo, la tercera población de TIL). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se produce después de la segunda expansión, incluyendo, por ejemplo en la población de TIL obtenida de la expansión en, por ejemplo, la Etapa D como se indica en la Figura 8.

[0866] **En** una realización, un método para alterar transitoriamente la expresión de proteínas en una población de TILs incluye la etapa de electroporación. Los métodos de electroporación son conocidos en la técnica y se describen, *por ejemplo,* en Tsong, Biophys. J. 1991, 60, 297-306, y Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2014/0227237 A1. En una realización, un método para alterar transitoriamente la expresión de proteínas en una población de TILs incluye la etapa de transfección de fosfato de calcio. Los métodos de transfección con fosfato cálcico (precipitación del ADN con fosfato cálcico, recubrimiento de la superficie celular y endocitosis) son conocidos en la técnica y se describen en Graham y van der Eb,; Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1979, 76, 1373-1376; y Chen and Okayarea, Mol. Cell. Biol. 1987, 7, 2745-2752, y en Patente de EE.UU. N.º 5,593,875. En una realización, un método para alterar transitoriamente la expresión de proteínas en una población de TILs incluye la etapa de transfección liposomal. Los métodos de transfección liposomal, como los métodos que emplean una formulación liposomal 1:1 (p/p) del lípido catiónico *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-n,n,n-trimetilamonio cloruro (DOTMA) y dioleoil fophotidiletanolamina (DOPE) en agua filtrada, son conocidos en la técnica y se describen en Rose, et al., y Felgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413-7417 y en Patentes de EE.UU. N.º 5,279,833; 5,908,635; 6,056,938; 6,110,490; 6,534,484; y 7,687,070. En una realización, un método para alterar transitoriamente la expresión de proteínas en una población de TILs incluye la etapa de transfección utilizando métodos descritos en Patentes de EE.UU. N.º 5,766,902; 6,025,337; 6,410,517; 6,475,994; y 7,189,705.

[0867] **En** algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de la proteína resulta en un aumento de las Células T Madre con Memoria (TSCMs). Las TSCM son progenitores tempranos de células T de memoria central experimentadas en antígenos. Por lo general, las TSCM muestran las capacidades de supervivencia a largo plazo, autorrenovación y multipotencia que definen a las células madre, y suelen ser deseables para la generación de productos TIL eficaces. Las TSCM han demostrado una mayor actividad antitumoral en comparación con otros subconjuntos de células T en modelos de ratón de transferencia celular adoptiva (Gattinoni et al. Nat Med 2009, 2011; Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012; Cieri et al. Blood 2013). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica da lugar a una población de TIL con una composición que comprende una alta proporción de TSCM. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica produce un aumento de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% del porcentaje de TSCM. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de la proteína da como resultado un aumento de al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 10 veces de las TSCM en la población de TIL. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de proteínas da como resultado una población de TIL con al menos al 5%, al menos al 10%, al menos al 10%, al menos al 20%, al menos al 25%, al menos al 30%, al menos al 35%, al menos al 40%, al menos al 45%, al menos al 50%, al menos al 55%, al menos al 60%, al menos al 65%, al menos al 70%, al menos al 75%, al menos al 80%, al menos al 85%, al menos al 90%, o al menos al 95% de TSCMs. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de proteínas da como resultado una población de TIL terapéuticos con al menos al 5%, al menos al 10%, al menos al 10%, al menos al 20%, al menos al 25%, al menos al 30%, al menos al 35%, al menos al 40%, al menos al 45%, al menos al 50%, al menos al 55%, al menos al 60%, al menos al 65%, al menos al 70%, al menos al 75%, al menos al 80%, al menos al 85%, al menos al 90%, o al menos al 95% de TSCMs.

[0868] **En** algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en el rejuvenecimiento de las células T experimentadas en antígenos. En algunas realizaciones, el rejuvenecimiento incluye, por ejemplo, un aumento de la proliferación, un aumento de la activación de las células T y/o un aumento del reconocimiento de antígenos.

[0869] **En** algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de la proteína altera la expresión en una gran fracción de las células T para preservar el repertorio TCR derivado del tumor. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica no altera el repertorio TCR derivado del tumor. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica mantiene el repertorio TCR derivado del tumor.

[0870] **En** algunas realizaciones, la alteración transitoria de la proteína resulta en la expresión alterada de un gen particular. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a un gen que incluye pero

no se limita a PD-1 (también denominado PDCD1 o CC279), TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCRs (receptores coestimuladores quiméricos), 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, y/o cAMP proteína quinasa A (PKA). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a un gen seleccionado del grupo que consiste en PD-1, TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCRs (receptores coestimuladores quiméricos), 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, y/o cAMP proteína quinasa A (PKA). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a PD-1. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a TGFBR2. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCR4/5. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CBLB. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CISH. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a los CCR (receptores coestimuladores quiméricos). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a la IL-2. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a la IL-12. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a la IL-15. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a la IL-21. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a NOTCH 1/2 ICD. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a TIM3. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a LAG3. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a TIGIT. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a TGFβ. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCR1. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCR2. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCR4. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCR5. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CXCR1. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CXCR2. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CSCR3. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCL2 (MCP-1). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCL3 (MIP-1α). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCL4 (MIP1-β). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCL5 (RANTES). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CXCL1. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CXCL8. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCL22. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CCL17. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a VHL. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a CD44. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a PIK3CD. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a SOCS1. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se dirige a la proteína cAMP quinasa A (PKA).

[0871] **En** algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en un aumento y/o sobreexpresión de un receptor de quimioquinas. En algunas realizaciones, el receptor de quimioquinas que se sobreexpresa mediante la expresión transitoria de proteínas incluye un receptor con un ligando que incluye pero no se limita a CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL8, CCL22, y/o CCL17.

[0872] **En** algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una disminución y/o reducción de la expresión de PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGFβR2, y/o TGFβ (incluso resultando en, por ejemplo, el bloqueo de la vía TGFβ). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de la proteína resulta en una disminución y/o reducción de la expresión de CBLB (CBL-B). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una disminución y/o reducción de la expresión de CISH.

[0873] En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en un aumento y/o sobreexpresión de receptores de quimioquinas para, por ejemplo, mejorar el tráfico o movimiento de TIL al sitio del tumor. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica da lugar a un aumento y/o sobreexpresión de un CCR (receptor coestimulador quimérico). En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en un aumento y/o sobreexpresión de un receptor de quimioquinas seleccionado del grupo que consiste en CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, y/o CSCR3.

[0874] En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en un aumento y/o sobreexpresión de una interleucina. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en un aumento y/o sobreexpresión de una interleucina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-12, IL-15, y/o IL-21.

[0875] **En** algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de la proteína resulta en un aumento y/o sobreexpresión de NOTCH 1/2 ICD. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de la proteína resulta en un aumento y/o sobreexpresión de VHL. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de la proteína resulta en un aumento y/o sobreexpresión de CD44. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión de la proteína resulta en un aumento y/o sobreexpresión de PIK3CD. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica da lugar a un aumento y/o sobreexpresión de SOCS1,

[0876] En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de la proteína cAMP quinasa A (PKA).

[0877] En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de una molécula seleccionada del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica da como resultado una expresión disminuida y/o reducida de dos moléculas seleccionadas del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1 y una molécula seleccionada del grupo que consiste en LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en la disminución y/o reducción de la expresión de PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1 y uno de LAG3, CISH, CBLB, TIM3, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1 y LAG3. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1 y CISH. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1 y CBLB. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de LAG3 y CISH. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de LAG3 y CBLB. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de CISH y CBLB. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de TIM3 y PD-1. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de TIM3 y LAG3. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de TIM3 y CISH. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de TIM3 y CBLB.

[0878] En algunas realizaciones, una molécula de adhesión seleccionada del grupo que consiste en CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, y combinaciones de las mismas, se inserta mediante un método gammaretroviral o lentiviral en la primera población de TILs, segunda población de TILs, o población recolecciónda de TILs (*por ejemplo,* se aumenta la expresión de la molécula de adhesión).

[0879] En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica resulta en una expresión disminuida y/o reducida de una molécula seleccionada del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), y combinaciones de las mismas, y expresión aumentada y/o mejorada de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica da como resultado una expresión disminuida y/o reducida de una molécula seleccionada del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CISH, CBLB, y combinaciones de las mismas, y una expresión aumentada y/o mejorada de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, y combinaciones de las mismas.

[0880] En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de alrededor del 5%, alrededor del 10%, alrededor del 10%, alrededor del 20%, alrededor del 25%, alrededor del 30%, alrededor del 35%, alrededor del 40%, alrededor del 45%, alrededor del 50%, alrededor del 55%, alrededor del 60%, alrededor del 65%, alrededor del 70%, alrededor del 75%, alrededor del 80%, alrededor del 85%, alrededor del 90%, o alrededor del 95%. En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, se produce una reducción de la expresión de al menos aproximadamente el 80%, el 85%, el 90%, o el 95%. En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 85%, En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 90%. En algunas realizaciones, hay una reducción de la expresión de al menos aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, hay una reducción de la expresión de al menos aproximadamente el 99%.

[0881] En algunas realizaciones, hay un aumento en la expresión de alrededor del 5%, alrededor del 10%, alrededor del 10%, alrededor del 20%, alrededor del 25%, alrededor del 30%, alrededor del 35%, alrededor del 40%, alrededor del 45%, alrededor del 50%, alrededor del 55%, alrededor del 60%, alrededor del 65%, alrededor del 70%, alrededor del 75%, alrededor del 80%, alrededor del 85%, alrededor del 90%, o alrededor del 95%. En algunas realizaciones, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión de al menos aproximadamente el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, o el 95%. En algunas realizaciones, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%.

En algunas realizaciones, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente el 80%. En algunas realizaciones, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente el 85%. En algunas realizaciones, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente el 90%. En algunas realizaciones, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente el 99%.

[0882] En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica se induce mediante el tratamiento de los TIL con factores de transcripción (TF) y/u otras moléculas capaces de alterar transitoriamente la expresión proteica en los TIL. En algunas realizaciones, la plataforma microfluídica sin vectores SQZ se emplea para la administración intracelular de los factores de transcripción (TF) y/u otras moléculas capaces de alterar transitoriamente la expresión proteica. Tales métodos demuestran la capacidad de administrar proteínas, incluidos factores de transcripción, a una variedad de células humanas primarias, incluidas las células T (Sharei et al. PNAS 2013, así como Sharei et al. PLOS ONE 2015 y Greisbeck et al. J. Immunology vol. 195, 2015); véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes internacionales WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1, y WO 2017/123663A1. Tales métodos como los descritos en las publicaciones de patentes internacionales WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1, y WO 2017/123663A1 pueden emplearse con la presente invención para exponer una población de TILs a factores de transcripción (TFs) y/u otras moléculas capaces de inducir la expresión transitoria de proteínas, en los que dichos TF y/u otras moléculas capaces de inducir la expresión transitoria de proteínas proporcionan un aumento de la expresión de antígenos tumorales y/o un aumento del número de células T específicas de antígenos tumorales en la población de TIL, dando lugar así a la reprogramación de la población de TIL y a un aumento de la eficacia terapéutica de la población de TIL reprogramada en comparación con una población de TIL no reprogramada. En algunas realizaciones, la reprogramación da como resultado una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la población inicial o previa (*es decir,* antes de la reprogramación) de TIL, como se describe en el presente documento.

[0883] En algunas realizaciones, el factor de transcripción (TF) incluye pero no se limita a TCF-1, NOTCH 1/2 ICD, y/o MYB. En algunas realizaciones, el factor de transcripción (TF) es TCF-1. En algunas realizaciones, el factor de transcripción (TF) es NOTCH 1/2 ICD. En algunas realizaciones, el factor de transcripción (TF) es MYB. En algunas realizaciones, el factor de transcripción (TF) se administra con el cultivo de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), como el sustituto de suero KNOCKOUT disponible comercialmente (Gibco/ThermoFisher), para inducir la reprogramación adicional de TIL. En algunas realizaciones, el factor de transcripción (TF) se administra con un cóctel de iPSC para inducir la reprogramación adicional de TIL. En algunas realizaciones, el factor de transcripción (TF) se administra sin un cóctel de iPSC. En algunas realizaciones, la reprogramación resulta en un aumento del porcentaje de TSCMs. En algunas realizaciones, la reprogramación da lugar a un aumento del porcentaje de TSCMs de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% de TSCMs.

[0884] En algunas realizaciones, un método de alteración transitoria de la expresión de proteínas, como se ha descrito anteriormente, puede combinarse con un método de modificación genética de una población de TILs incluye la etapa de incorporación estable de genes para la producción de una o más proteínas. En ciertas realizaciones, el método comprende una etapa de modificar genéticamente una población de TILs. En ciertas realizaciones, el método comprende modificar genéticamente la primera población de TILs, la segunda población de TILs y/o la tercera población de TILs. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transducción retroviral. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transducción lentiviral. Los sistemas de transducción lentiviral son conocidos en la técnica y se describen, *por ejemplo*, en 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, y Patente de EE. UU. N.º 6,627,442. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transducción gamma-retroviral. Los sistemas de transducción gammaretroviral son conocidos en la técnica y se describen, *por ejemplo*, en Cepko y Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transferencia de genes mediada por transposones. Los sistemas de transferencia de genes mediados por transposones son conocidos en la técnica e incluyen sistemas en los que la transposasa se proporciona como vector de expresión de ADN o como un ARN expresable o una proteína tal que la expresión a largo plazo de la transposasa no se produce en las células transgénicas, por ejemplo, una transposasa proporcionada como un ARNm (*por ejemplo,* un ARNm que comprende una caperuza y una cola poli-A). Los sistemas adecuados de transferencia de genes mediada por transposones, incluida la transposasa tipo Tel de tipo salmónido (SB o transposasa de la Bella Durmiente), como SB 10, SB11, y SB 100x, y las enzimas de ingeniería con mayor actividad enzimática, se describen en, *por ejemplo*, Hackett, et al. Patente de EE. UU. N.º 6,489,458.

[0885] En algunas realizaciones, la alteración transitoria de la expresión proteica es una reducción de la expresión inducida por ARN de interferencia autodifusor (ARNsd), que es un dúplex de ARNsi asimétrico sintetizado químicamente con un alto porcentaje de sustituciones 2'-OH (típicamente flúor u -OCH_3) que comprende una cadena antisentido (guía) de 20 nucleótidos y una cadena sentido (pasajero) de 13 a 15 bases conjugada con colesterol en su extremo 3' mediante un enlazador de tetraetilenglicol (TEG). En algunas realizaciones, el método comprende la alteración transitoria de la expresión de proteínas en una población de TIL, que comprende el uso de ARN de interferencia autodifusor (ARNsd), que es un dúplex de ARNsi asimétrico sintetizado químicamente con un alto porcentaje de sustituciones 2'-OH (típicamente

flúor u -OCH_3) que comprende una cadena antisentido (guía) de 20 nucleótidos y una cadena sentido (pasajero) de 13 a 15 bases conjugada con colesterol en su extremo 3' mediante un enlazador de tetraetilenglicol (TEG). Los métodos para utilizar ARNsd se han descrito en Khvorova y Watts, Nat. Biotechnol. 2017, 35, 238-248; Byrne, et al., J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2013, 29, 855-864; y Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018, in press. En una realización, la administración de ARNsd a una población de TIL se logra sin usar electroporación, SQZ, u otros métodos, usando en su lugar un periodo de 1 a 3 días en el que una población de TIL se expone a ARNsd a una concentración de 1 µM/10.000 TIL en medio. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar ARNsd a una población de TILs que comprende exponer la población de TILs a ARNsd a una concentración de 1 µM/10.000 TILs en medio durante un periodo de entre 1 y 3 días. En una realización, la administración de ARNsd a una población TIL se logra usando un periodo de 1 a 3 días en el que una población TIL se expone a ARNsd a una concentración de 10 µM/10.000 TILs en medio. En una realización, la administración de ARNsd a una población TIL se logra usando un periodo de 1 a 3 días en el que una población TIL se expone a ARNsd a una concentración de 50 µM/10.000 TILs en medio. En una realización, la administración de ARNsd a una población TIL se logra usando un periodo de 1 a 3 días en el que una población TIL se expone a ARNsd a una concentración de entre 0,1 µM/10.000 TILs y 50 µM/10.000 TILs en medio. En una realización, la administración de ARNsd a una población de TIL se logra usando un periodo de 1 a 3 días en el que una población de TIL se expone a ARNsd a una concentración de entre 0,1 µM/10.000 TILs y 50 µM/10.000 TILs en el medio, en el que la exposición a ARNsd se realiza dos, tres, cuatro, o cinco veces mediante la adición de ARNsd fresco al medio. Otros procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2011/0039914 A1, US 2013/0131141 A1, y US 2013/0131142 A1, y Patente de EE.UU. N.º 9,080,171.

[0886] En algunas realizaciones, el ARNsd se inserta en una población de TILs durante la fabricación. En algunas realizaciones, el ARNsd codifica ARN que interfiere con NOTCH 1/2 ICD, PD-1, CTLA-4 TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGFβ, TGFBR2, cAMP proteína quinasa A (PKA), BAFF BR3, CISH, y/o CBLB. En algunas realizaciones, la reducción de la expresión se determina basándose en un porcentaje de silenciamiento génico, por ejemplo, evaluado por citometría de flujo y/o qPCR. En algunas realizaciones, hay una reducción de la expresión de alrededor del 5%, alrededor del 10%, alrededor del 10%, alrededor del 20%, alrededor del 25%, alrededor del 30%, alrededor del 35%, alrededor del 40%, alrededor del 45%, alrededor del 50%, alrededor del 55%, alrededor del 60%, alrededor del 65%, alrededor del 70%, alrededor del 75%, alrededor del 80%, alrededor del 85%, alrededor del 90%, o alrededor del 95%. En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, se produce una reducción de la expresión de al menos aproximadamente el 80%, el 85%, el 90%, o el 95%. En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 85%, En algunas realizaciones, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente el 90%. En algunas realizaciones, hay una reducción de la expresión de al menos aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, hay una reducción de la expresión de al menos aproximadamente el 99%.

[0887] **La** tecnología de ARNi autoadministrable basada en la modificación química de ARNsi puede emplearse con los métodos de la presente invención para administrar con éxito ARNsd a los TILs como se describe en el presente documento. La combinación de modificaciones de la columna vertebral con la estructura asimétrica del ARNsi y un ligando hidrófobo (*véase,* por ejemplo, Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018 y US20160304873) permiten que ARNsd penetren en células de mamífero cultivadas sin formulaciones ni métodos adicionales mediante la simple adición a los medios de cultivo, capitalizando la estabilidad de las nucleasas de ARNsd. Esta estabilidad permite mantener niveles constantes de reducción de la actividad del gen diana mediada por ARNi simplemente manteniendo la concentración activa de ARNsd en el medio. Sin estar atado por la teoría, la estabilización de la columna vertebral del ARNsd proporciona una reducción prolongada de los efectos de la expresión génica que puede durar meses en las células que no se dividen.

[0888] En algunas realizaciones, se produce una eficiencia de transfección de TILs superior al 95% y una reducción de la expresión de la diana por varios ARNsd específicos. En algunas realizaciones, los ARNsd que contienen varios residuos de ribosa no modificados se sustituyeron por secuencias totalmente modificadas para aumentar la potencia y/o la longevidad del efecto del ARNi. En algunas realizaciones, el efecto de reducción de la expresión se mantiene durante 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 5 días, 6 días, 7 días, u 8 días o más. En algunas realizaciones, el efecto de reducción de la expresión disminuye a los 10 días o más tras el tratamiento con ARNsd de los TIL. En algunas realizaciones, se mantiene una reducción de más del 70% en la expresión de la diana. En algunas realizaciones, se mantiene una reducción de más del 70% en la expresión de la diana TILs. En algunas realizaciones, una reducción de la expresión en la vía PD-1/PD-L1 permite que los TIL exhiban un efecto in vivo más potente, que es en algunas realizaciones, debido a la evitación de los efectos supresores de la vía PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, una reducción en la expresión de PD-1 por ARNsd resulta en un aumento de la proliferación de TIL.

[0889] El ARN de interferencia pequeño (ARNsi), a veces conocido como ARN de interferencia corto o ARN silenciador, es una molécula de ARN de doble cadena, generalmente de 19-25 pares de bases de longitud. El ARNsi se utiliza en la interferencia de ARN (ARNi), donde interfiere con la expresión de genes específicos con secuencias de nucleótidos complementarias.

[0890] El ADN bicatenario (ARNds) puede utilizarse generalmente para definir cualquier molécula que comprenda un par de cadenas complementarias de ARN, generalmente una cadena sentido (pasajero) y una cadena antisentido (guía), y puede incluir regiones voladizas monocatenario. El término ARNds, en contraste con el ARNsi, se refiere generalmente a una molécula precursora que incluye la secuencia de una molécula de ARNsi que se libera de la molécula de ARNds más grande por la acción de sistemas enzimáticos de escisión, incluido Dicer.

[0891] Los ARNsd (ARN autoliberables) son una nueva clase de compuestos de ARNi modificados covalentemente que no requieren un vehículo de liberación para entrar en las células y tienen una farmacología mejorada en comparación con los ARNsi tradicionales. El "ARN autoadministrado" o "ARNsd" es un híbrido de ARN interferente-antisentido modificado hidrofóbicamente, que ha demostrado ser altamente eficaz *in vitro* en células primarias e in vivo tras su administración local. Se ha demostrado una captación robusta y/o silenciamiento sin toxicidad. Los sdARN son generalmente moléculas de ácido nucleico modificadas químicamente asimétricas con regiones bicatenarias mínimas. Las moléculas de sdARN normalmente contienen regiones monocatenarias y bicatenarias, y pueden contener una variedad de modificaciones químicas dentro de las regiones monocatenarias y bicatenarias de la molécula. Además, las moléculas de ARNsd pueden unirse a un conjugado hidrófobo como una molécula de tipo esterol convencional y avanzada, como se describe en el presente documento. Los ARNsd y los métodos asociados para fabricar dichos ARNsd también se han descrito ampliamente en, por ejemplo, US20160304873, WO2010033246, WO2017070151, WO2009102427, WO2011119887, WO2010033247A2, WO2009045457, WO2011119852. Para optimizar la estructura, la química, la posición de orientación, las preferencias de secuencia, y similares del ARNsd, se ha desarrollado y utilizado un algoritmo propio para la predicción de la potencia del ARNsd (*véase,* por ejemplo, US 20160304873). Basándose en estos análisis, las secuencias de ARNsd funcionales se han definido generalmente como aquellas que tienen más de un 70% de reducción en la expresión a una concentración de 1 µM, con una probabilidad superior al 40%.

[0892] En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción del 70% en la expresión del gen diana. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción del 75% en la expresión del gen diana. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción del 80% en la expresión del gen diana. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción del 85% en la expresión del gen diana. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción del 90% en la expresión del gen diana. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción del 95% en la expresión del gen diana. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción del 99% en la expresión del gen diana. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 0,25 µM a aproximadamente 4 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 0,25 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 0,5 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 0,75 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 1,0 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 1,25 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 1,5 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 1,75 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 2,0 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 2,25 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 2,5 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 2,75 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 3,0 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 3,25 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 3,5 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 3,75 µM. En algunas realizaciones, las secuencias de ARNsd utilizadas en la invención muestran una reducción de la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 4,0 µM.

[0893] **En** algunas realizaciones, los agentes oligonucleótidos comprenden una o más modificaciones para aumentar la

estabilidad y/o efectividad del agente terapéutico, y para efectuar una entrega eficiente del oligonucleótido a las células o tejido a tratar. Dichas modificaciones pueden incluir una modificación 2'-O-metilo, una modificación 2'-O-fluro, una modificación difosforotioato, un nucleótido modificado 2' F, un nucleótido modificado 2'-O-metilo y/o un nucleótido 2'deoxi. En algunas realizaciones, el oligonucleótido se modifica para incluir una o más modificaciones hidrofóbicas que incluyen, por ejemplo, esterol, colesterol, vitamina D, naftilo, isobutilo, bencilo, indol, triptófano, y/o fenilo. En una realización particular adicional, los nucleótidos modificados químicamente son combinaciones de fosforotioatos, 2'-O-metilos, 2'deoxi, modificaciones hidrofóbicas y fosforotioatos. En algunas realizaciones, los azúcares pueden ser modificados y los azúcares modificados pueden incluir pero no se limitan a D-ribosa, 2'-O-alquilo (incluyendo 2'-O-metilo y 2'-0-etilo), es decir, 2'-alcoxi, 2'-amino, 2'-S-alquilo, 2'-halo (incluyendo 2'-fluoro), T-metoxietoxi, 2'-aliloxi (-$OCH_2CH=CH_2$), 2'-propargilo, 2'-propilo, etinilo, etenilo, propenilo, y ciano y similares. En una realización, la fracción de azúcar puede ser una hexosa e incorporarse a un oligonucleótido como se describe (Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)).

[0894] **En** algunas realizaciones, el oligonucleótido bicatenario de la invención es bicatenario en toda su longitud, es decir , sin secuencia monocatenario sobresaliente en ninguno de los extremos de la molécula, es decir, es de extremo romo. En algunas realizaciones, las moléculas individuales de ácido nucleico pueden ser de diferentes longitudes. En otras palabras, un oligonucleótido bicatenario de la invención no es bicatenario en toda su longitud. Por ejemplo, cuando se utilizan dos moléculas de ácido nucleico separadas, una de las moléculas, por ejemplo, la primera molécula que comprende una secuencia antisentido, puede ser más larga que la segunda molécula que hibrida con ella (dejando una parte de la molécula monocatenaria). En algunas realizaciones, cuando se utiliza una única molécula de ácido nucleico, una parte de la molécula en cualquiera de sus extremos puede permanecer monocatenaria.

[0895] **En** algunas realizaciones, un oligonucleótido bicatenario de la invención contiene desajustes y/o bucles o protuberancias, pero es bicatenario en al menos aproximadamente el 70% de la longitud del oligonucleótido. En algunas realizaciones, un oligonucleótido bicatenario de la invención es bicatenario en al menos aproximadamente el 80% de la longitud del oligonucleótido. En otra realización, un oligonucleótido bicatenario de la invención es bicatenario en al menos aproximadamente el 90%-95% de la longitud del oligonucleótido. En algunas realizaciones, un oligonucleótido bicatenario de la invención es bicatenario en al menos aproximadamente el 96%-98% de la longitud del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el oligonucleótido bicatenario de la invención contiene al menos o hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 desajustes.

[0896] En algunas realizaciones, el oligonucleótido puede protegerse sustancialmente de las nucleasas, por ejemplo, modificando los enlaces 3' o 5' (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º 5,849,902 y WO 98/13526). Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden hacerse resistentes mediante la inclusión de un "grupo bloqueador". El término "grupo bloqueador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a sustituyentes (por ejemplo, distintos de grupos OH) que pueden unirse a oligonucleótidos o nucleómeros, ya sea como grupos protectores o grupos de acoplamiento para síntesis (por ejemplo, FITC, propil (CH_2-CH_2-CH_3), glicol (-O-CH_2-CH_2-O-) fosfato (PO_3^{2-}), fosfonato de hidrógeno, o fosforamidito). "Grupos bloqueadores" también pueden incluir "grupos bloqueadores de extremos" o "grupos bloqueadores de exonucleasas" que protegen los extremos 5' y 3' del oligonucleótido, incluyendo nucleótidos modificados y estructuras resistentes a exonucleasas no nucleotídicas.

[0897] **En** algunas realizaciones, al menos una porción de los polinucleótidos contiguos dentro del ARNsd están unidos por un enlace sustitutivo, *por ejemplo*, un enlace fosforotioato.

[0898] En algunas realizaciones, la modificación química puede conducir a al menos 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 aumentos en la captación celular. En algunas realizaciones, al menos uno de los residuos C o U incluye una modificación hidrofóbica. En algunas realizaciones, una pluralidad de Cs y Us contienen una modificación hidrófoba. En algunas realizaciones, al menos el 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o al menos el 95% de los Cs y Us pueden contener una modificación hidrófoba. En algunas realizaciones, todos los Cs y Us contienen una modificación hidrófoba.

[0899] **En** algunas realizaciones, el ARNsd o sd-rxARNs exhiben una liberación endosomal mejorada de moléculas de sd-rxARN a través de la incorporación de aminas protonables. En algunas realizaciones, las aminas protonables se incorporan en la cadena de sentido (en la parte de la molécula que se descarta tras la carga de RISC). En algunas realizaciones, los compuestos de ARNsd de la invención comprenden un compuesto asimétrico que comprende una región dúplex (necesaria para la entrada eficiente de RISC de 10-15 bases de longitud) y una región monocatenaria de 4-12 nucleótidos de longitud; con un dúplex de 13 nucleótidos. En algunas realizaciones, se emplea una región monocatenaria de 6 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región monocatenaria del ARNsd comprende 2-12 enlaces intemucleotídicos de fosforotioato (denominados modificaciones de fosforotioato). En algunas realizaciones, se emplean enlaces intemucleótidos de 6-8 fosforotioatos. En algunas realizaciones, los compuestos de ARNsd de la invención también incluyen un patrón de modificación química único, que proporciona estabilidad y es compatible con la entrada RISC.

[0900] La cadena guía, por ejemplo, también puede ser modificada por cualquier modificación química que confirme la estabilidad sin interferir con la entrada de RISC. En algunas realizaciones, el patrón de modificación química en la cadena

guía incluye la mayoría de nucleótidos C y U modificados en 2' F y el extremo 5' fosforilado.

[0901] En algunas realizaciones, al menos el 30% de los nucleótidos en el ARNsd o sd-rxARN están modificados. En algunas realizaciones, al menos el 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%, o 99% de los nucleótidos en el ARNsd o sd-ARNrx están modificados. En algunas realizaciones, el 100% de los nucleótidos en el ARNsd o sd-rxARN están modificados.

[0902] En algunas realizaciones, las moléculas de ARNsd tienen regiones de doble cadena mínimas. En algunas realizaciones, la región de la molécula que es de doble cadena tiene una longitud de 8-15 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región de la molécula que es de doble cadena tiene una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región bicatenaria tiene una longitud de 13 nucleótidos. Puede haber una complementariedad del 100% entre las hebras guía y pasajera, o puede haber una o más discordancias entre las hebras guía y pasajera. En algunas realizaciones, en un extremo de la molécula bicatenaria, la molécula está despuntada o tiene un saliente de un nucleótido. En algunas realizaciones, la región monocatenaria de la molécula tiene una longitud de entre 4 y 12 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región monocatenaria puede tener una longitud de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región monocatenaria también puede tener menos de 4 o más de 12 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, la región monocatenaria tiene una longitud de 6 o 7 nucleótidos.

[0903] En algunas realizaciones, las moléculas de ARNsd tienen una mayor estabilidad. En algunos casos, una molécula de ARNsd o sd-ARNrx modificada químicamente tiene una semivida en medios que es superior a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más de 24 horas, incluyendo cualquier valor intermedio. En algunas realizaciones, el sd-rxARN tiene una semivida en el medio superior a 12 horas.

[0904] En algunas realizaciones, el ARNsd se optimiza para aumentar la potencia y/o reducir la toxicidad. En algunas realizaciones, la longitud nucleotídica de la cadena guía y/o pasajera, y/o el número de modificaciones fosforotioato en la cadena guía y/o pasajera, pueden en algunos aspectos influir en la potencia de la molécula de ARN, mientras que la sustitución de modificaciones 2'-fluoro (2'F) por modificaciones 2'-0-metil (2'OMe) puede en algunos aspectos influir en la toxicidad de la molécula. En algunas realizaciones, se predice que la reducción del contenido de 2'F de una molécula reduce la toxicidad de la molécula. En algunas realizaciones, el número de modificaciones de fosforotioato en una molécula de ARN puede influir en la captación de la molécula en una célula, por ejemplo la eficiencia de la captación pasiva de la molécula en una célula. En algunas realizaciones, el ARNsd no tiene modificación 2'F y sin embargo se caracterizan por igual eficacia en la captación celular y la penetración tisular.

[0905] En algunas realizaciones, una cadena guía tiene aproximadamente 18-19 nucleótidos de longitud y tiene aproximadamente 2-14 modificaciones de fosfato. Por ejemplo, una cadena guía puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más de 14 nucleótidos fosfatemodificados. La cadena guía puede contener una o más modificaciones que confieran una mayor estabilidad sin interferir en la entrada de RISC. Los nucleótidos modificados con fosfato, como los nucleótidos modificados con fosforotioato, pueden estar en el extremo 3', en el extremo 5' o repartidos por toda la cadena guía. En algunas realizaciones, los 10 nucleótidos terminales 3' de la cadena guía contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos modificados con fosforotioato. La cadena guía también puede contener modificaciones 2'F y/o 2'OMe, que pueden localizarse en toda la molécula. En algunas realizaciones, el nucleótido en la posición uno de la cadena guía (el nucleótido en la posición más 5' de la cadena guía) está 2'OMe modificado y/o fosforilado. Los nucleótidos C y U de la cadena guía pueden modificarse en 2'F. Por ejemplo, los nucleótidos C y U en las posiciones 2-10 de una cadena guía de 19 nt (o las posiciones correspondientes en una cadena guía de una longitud diferente) pueden modificarse en 2'F. Los nucleótidos C y U de la cadena guía también pueden modificarse con 2'OMe. Por ejemplo, los nucleótidos C y U en las posiciones 11-18 de una cadena guía de 19 nt (o las posiciones correspondientes en una cadena guía de longitud diferente) pueden modificarse en 2'OMe. En algunas realizaciones, el nucleótido en el extremo más 3' de la cadena guía no está modificado. En ciertas realizaciones, la mayoría de Cs y Us dentro de la cadena guía están modificados en 2'F y el extremo 5' de la cadena guía está fosforilado. En otras realizaciones, la posición 1 y los Cs o Us en las posiciones 11-18 están modificados 2'OMe y el extremo 5' de la cadena guía está fosforilado. En otras realizaciones, la posición 1 y los Cs o Us en las posiciones 11-18 están modificados 2'OMe, el extremo 5' de la cadena guía está fosforilado, y los Cs o Us en la posición 2-10 están modificados 2'F.

[0906] **La** tecnología de ARNi autodifundible proporciona un método para transfectar directamente las células con el agente de ARNi, sin necesidad de formulaciones o técnicas adicionales. La capacidad de transfectar líneas celulares difíciles de transfectar, la alta actividad *in vivo*, y la simplicidad de uso, son características de las composiciones y métodos que presentan ventajas funcionales significativas sobre las técnicas tradicionales basadas en ARNsi, y como tales, los métodos de ARNsd se emplean en varias realizaciones relacionadas con los métodos de reducción de la expresión del gen diana en los TIL de la presente invención. Los métodos sdARNi permiten la administración directa de compuestos sintetizados químicamente a una amplia gama de células y tejidos primarios, tanto *ex vivo* como *in vivo*. Los ARNsd descritos en algunas realizaciones de la invención están disponibles comercialmente en Advirna LLC, Worcester, MA, USA.

[0907] Los ARNsd se forman como estructuras híbridas de ARNsi-antisentido modificadas hidrofóbicamente, y se

divulgan, por ejemplo en Byrne et al., diciembre de 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutics, 29(10): 855-864.

[0908] En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ARNsd se pueden administrar a los TILs descritos aquí usando electroporación estéril. En ciertas realizaciones, el método comprende la electroporación estéril de una población de TILs para administrar oligonucleótidos de ARNsd.

[0909] En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pueden administrarse a las células en combinación con un sistema de administración transmembrana. En algunas formas de realización, este sistema de administración transmembrana comprende lípidos, vectores virales y similares. En algunas realizaciones, el agente oligonucleótido es un agente de ARNi de autoentrega, que no requiere ningún agente de entrega. En ciertas realizaciones, el método comprende el uso de un sistema de administración transmembrana para administrar oligonucleótidos de ARNsd a una población de TILs.

[0910] Los oligonucleótidos y las composiciones de oligonucleótidos se ponen en contacto con (p. ej., se ponen en contacto con, también denominado en el presente documento administrado o entregado a) y son captados por los TIL descritos en el presente documento, incluso mediante captación pasiva por los TIL. El ARNsd puede añadirse a los TIL como se describe en el presente documento durante la primera expansión, por ejemplo la Etapa B, después de la primera expansión, por ejemplo, durante la Etapa, antes o durante la segunda expansión, por ejemplo antes o durante la Etapa D, después de la Etapa D y antes de la recolección en la Etapa E, durante o después de la recolección en la Etapa F, antes o durante la formulación final y/o la transferencia a la bolsa de infusión en la Etapa F, así como antes de cualquier etapa opcional de crioconservación en la Etapa F. Además, el ARNsd puede añadirse después de la descongelación de cualquier etapa de crioconservación en la Etapa F. En una realización, uno o más ARNsd dirigidos a genes como se describe en el presente documento, incluyendo PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH, y CBLB, pueden añadirse a medios de cultivo celular que comprenden TILs y otros agentes a concentraciones seleccionadas del grupo que consiste en 100 nM a 20 mM, 200 nM a 10 mM, 500 nm a 1 mM, 1 µM a 100 µM, y 1 µM a 100 µM. En una realización, uno o más ARNsd dirigidos a genes según se describe en el presente documento, incluyendo PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH, y CBLB, pueden añadirse a medios de cultivo celular que comprenden TILs y otros agentes en cantidades seleccionadas del grupo que consiste en de 0,1 µM de ARNsd/10 000 TIL/100 µL de medio, 0,5 µM de ARNsd/10 000 TIL/100 µL de medio, 0,75 µM de ARNsd/10 000 TIL/100 µL de medio, 1 µM de ARNsd/10 000 TIL/100 µL de medio, 1,25 µM de ARNsd/10 000 TIL/100 µL de medio, 1,5 µM de ARNsd/10 000 TIL/100 µL de medio, 2 µM de ARNsd/10 000 TIL/100 µL de medio, 5 µM de ARNsd/10 000 TIL /100 µL de medio, o 10 µM ARNsd/10 000 TIL/100 µL de medio. En una realización, uno o más ARNsd dirigidos a genes como los descritos en el presente documento, incluidos PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH, y CBLB, pueden añadirse a cultivos de TIL durante las fases pre-REP o REP dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, o cada siete días.

[0911] Las composiciones de oligonucleótidos de la invención, incluyendo ARNsd, pueden ponerse en contacto con TILs como se describe en el presente documento durante el proceso de expansión, por ejemplo disolviendo ARNsd a altas concentraciones en medios de cultivo celular y dejando tiempo suficiente para que se produzca la captación pasiva. En ciertas realizaciones, el método de la presente invención comprende poner en contacto una población de TILs con una composición de oligonucleótidos como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el método comprende disolver un oligonucleótido, p. ej. ARNsd, en un medio de cultivo celular y poner en contacto el medio de cultivo celular con una población de TILs. Los TIL pueden ser una primera población, una segunda población y/o una tercera población como se describe en el presente documento.

[0912] En algunas realizaciones, el suministro de oligonucleótidos a las células puede mejorarse mediante métodos adecuados reconocidos en la técnica, incluyendo fosfato de calcio, DMSO, glicerol o dextrano, electroporación, o mediante transfección, p. ej., utilizando composiciones lipídicas catiónicas, aniónicas o neutras o liposomas utilizando métodos conocidos en la técnica (*véase,* p. ej., WO 90/14074; WO 91/16024; WO 91/17424; Pat. de EE.UU. Nº 4.897.355; Bergan et a 1993. Nucleic Acids Research. 21:3567).

[0913] En algunas realizaciones, se utiliza más de un ARNsd para reducir la expresión de un gen diana. En algunas realizaciones, uno o más de los ARNsd PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 y/o CISH diana se utilizan juntos. En algunas realizaciones, una ARNsd PD-1 se utiliza con uno o más de TIM-3, CBLB, LAG3 y/o CISH para reducir la expresión de más de un gen diana. En algunas realizaciones, un ARNsd LAG3 se utiliza en combinación con un ARNsd diana CISH para reducir la expresión génica de ambas dianas. En algunas realizaciones, los ARNsd dirigidos a uno o más de PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 y/o CISH están disponibles comercialmente en Advirna LLC, Worcester, MA, USA.

[0914] En algunas realizaciones, el ARNsd se dirige a un gen seleccionado del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el ARNsd se dirige a un gen seleccionado del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un ARNsd se dirige a PD-1 y otro ARNsd se dirige a un gen seleccionado del grupo que consiste en LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el ARNsd se dirige a un gen seleccionado entre PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el ARNsd se dirige a un gen seleccionado de PD-1 y uno de LAG3, CISH, CBLB, TIM3, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un ARNsd se dirige a PD-1 y un ARNsd se dirige a LAG3. En algunas realizaciones, un ARNsd se dirige a PD-1 y un ARNsd se dirige a CISH. En algunas realizaciones, un ARNsd se dirige a PD-1 y un ARNsd se dirige a CBLB.

En algunas realizaciones, un ARNsd se dirige a LAG3 y un ARNsd se dirige a CISH. En algunas realizaciones, un ARNsd se dirige a LAG3 y un ARNsd se dirige a CBLB. En algunas realizaciones, un ARNsd se dirige a CISH y un ARNsd se dirige a CBLB. En algunas realizaciones, un ARNsd tiene como diana TIM3 y un ARNsd tiene como diana PD-1. En algunas realizaciones, un ARNsd se dirige a TIM3 y un ARNsd se dirige a LAG3. En algunas realizaciones, un ARNsd se dirige a TIM3 y un ARNsd se dirige a CISH. En algunas realizaciones, un ARNsd se dirige a TIM3 y un ARNsd se dirige a CBLB.

[0915] Como se discutió anteriormente, las realizaciones de la presente invención proporcionan linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) que han sido modificados genéticamente a través de la edición de genes para mejorar su efecto terapéutico. Las realizaciones de la presente invención abarcan la edición genética mediante la inserción de nucleótidos (ARN o ADN) en una población de TILs tanto para la promoción de la expresión de una o más proteínas como para la inhibición de la expresión de una o más proteínas, así como combinaciones de las mismas. Las realizaciones de la presente invención también proporcionan métodos para expandir los TIL en una población terapéutica, en los que los métodos comprenden la edición genética de los TIL. Existen varias tecnologías de edición genética que pueden utilizarse para modificar genéticamente una población de TIL, que son adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención.

[0916] **En** algunas realizaciones, el método comprende un método de modificación genética de una población de TILs que incluye la etapa de incorporación estable de genes para la producción de una o más proteínas. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transducción retroviral. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transducción lentiviral. Los sistemas de transducción lentiviral son conocidos en la técnica y se describen, *por ejemplo*, en 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, y Patente de EE. UU. N.º 6,627,442. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transducción gamma-retroviral. Los sistemas de transducción gamma-retroviral son conocidos en la técnica y se describen, *por ejemplo,* en Cepko y Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transferencia de genes mediada por transposones. Los sistemas de transferencia de genes mediados por transposones son conocidos en la técnica e incluyen sistemas en los que la transposasa se proporciona como vector de expresión de ADN o como un ARN expresable o una proteína tal que la expresión a largo plazo de la transposasa no se produce en las células transgénicas, por ejemplo, una transposasa proporcionada como un ARNm (*por ejemplo,* un ARNm que comprende una caperuza y una cola poli-A). Los sistemas adecuados de transferencia de genes mediada por transposones, incluida la transposasa tipo Tel de tipo salmónido (SB o transposasa de la Bella Durmiente), como SB 10, SB11, y SB 100x, y las enzimas de ingeniería con mayor actividad enzimática, se describen en, *por ejemplo*, Hackett, et al. Patente de EE. UU. N.º 6,489,458.

[0917] En una realización, el método comprende un método de modificación genética de una población de TILs, por ejemplo, una primera población, una segunda población y/o una tercera población como se describe en el presente documento. En una realización, un método de modificación genética de una población de TIL incluye la etapa de incorporación estable de genes para la producción o inhibición (por ejemplo, silenciamiento) de una o más proteínas. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de electroporación. Los métodos de electroporación son conocidos en la técnica y se describen, *por ejemplo,* en Tsong, Biophys. J. 1991, 60, 297-306, y Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2014/0227237 A1. Otros métodos de electroporación conocidos en la técnica, como los descritos en Patentes de EE.UU. N.º 5,019,034; 5,128,257; 5,137,817; 5,173,158; 5,232,856; 5,273,525; 5,304,120; 5,318,514; 6,010,613 y 6,078,490 pueden utilizarse. En una realización, el método de electroporación es un método de electroporación estéril. En una realización, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada. En una realización, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada que comprende las etapas de tratar TILs con campos eléctricos pulsados para alterar, manipular, o causar cambios definidos y controlados, permanentes o temporales en los TILs, comprendiendo la etapa de aplicar una secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de CC únicos, controlados por el operador, programados independientemente, que tienen intensidades de campo iguales o superiores a 100 V/cm, a los TILs, donde la secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de CC tiene una, dos, o tres de las siguientes características: (1) al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en amplitud de pulso; (2) al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en anchura de pulso; y (3) un primer intervalo de pulso para un primer conjunto de dos de los al menos tres pulsos es diferente de un segundo intervalo de pulso para un segundo conjunto de dos de los al menos tres pulsos. En una realización, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada que comprende las etapas de tratar TILs con campos eléctricos pulsados para alterar, manipular, o causar cambios definidos y controlados, permanentes o temporales, en los TILs, comprendiendo la etapa de aplicar una secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de CC únicos, controlados por el operador, programados independientemente, que tienen intensidades de campo iguales o superiores a 100 V/cm, a los TILs, en los que al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en amplitud de pulso. En una realización, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada que comprende las etapas de tratar TILs con campos eléctricos pulsados para alterar, manipular, o causar cambios definidos y controlados, permanentes o temporales, en los TILs, comprendiendo la etapa de aplicar una secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de CC únicos, controlados por el operador, programados independientemente, con intensidades de campo iguales o superiores a 100 V/cm, a los TILs, en los que al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en anchura de pulso. En una realización, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada que comprende las etapas de tratar TILs con campos eléctricos pulsados para alterar, manipular, o causar cambios definidos y controlados, permanentes o temporales en los TILs, comprendiendo la etapa de aplicar una secuencia de al menos tres

pulsos eléctricos de CC únicos, controlada por el operador, programada independientemente, pulsos eléctricos de CC, con intensidades de campo iguales o superiores a 100 V/cm, a los TIL, en la que un primer intervalo de pulsos para un primer conjunto de dos de los al menos tres pulsos es diferente de un segundo intervalo de pulsos para un segundo conjunto de dos de los al menos tres pulsos. En una realización, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada que comprende las etapas de tratar TILs con campos eléctricos pulsados para inducir la formación de poros en los TILs, comprendiendo la etapa de aplicar una secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de CC, con intensidades de campo iguales o superiores a 100 V/cm, a los TILs, donde la secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de CC tiene una, dos o tres de las siguientes características: (1) al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en amplitud de pulso; (2) al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en anchura de pulso; y (3) un primer intervalo de pulso para un primer conjunto de dos de los al menos tres pulsos es diferente de un segundo intervalo de pulso para un segundo conjunto de dos de los al menos tres pulsos, de forma que los poros inducidos se mantienen durante un periodo de tiempo relativamente largo, y de forma que se mantiene la viabilidad de los TIL. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transfección de fosfato de calcio. Los métodos de transfección con fosfato cálcico (precipitación del ADN con fosfato cálcico, recubrimiento de la superficie celular y endocitosis) son conocidos en la técnica y se describen en Graham y van der Eb,; Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1979, 76, 1373-1376; y Chen and Okayarea, Mol. Cell. Biol. 1987, 7, 2745-2752, y en Patente de EE.UU. N.º 5,593,875. En una realización, un método para modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transfección liposomal. Los métodos de transfección liposomal, como los métodos que emplean una formulación liposomal 1:1 (p/p) del lípido catiónico N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-n,n,n-trimetilamonio cloruro (DOTMA) y dioleoil fophotidiletanolamina (DOPE) en agua filtrada, son conocidos en la técnica y se describen en Rose, et al., y Felgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413-7417 y en Patentes de EE.UU. N.º 5,279,833; 5,908,635; 6,056,938; 6,110,490; 6,534,484; y 7,687,070,. En una realización, un método de modificar genéticamente una población de TILs incluye la etapa de transfección usando métodos descritos en Patentes de EE.UU. N.º 5,766,902; 6,025,337; 6,410,517; 6,475,994; y 7,189,705. Los TIL pueden ser una primera población, una segunda población y/o una tercera población de TIL como se describe en el presente documento.

[0918] Según una realización, el proceso de edición genética puede comprender el uso de una nucleasa programable que media la generación de una rotura de doble cadena o de cadena simple en uno o más genes de punto de control inmunitario. Estas nucleasas programables permiten la edición precisa del genoma mediante la introducción de roturas en loci genómicos específicos, es decir , se basan en el reconocimiento de una secuencia específica de ADN dentro del genoma para dirigir un dominio de nucleasa a esta ubicación y mediar en la generación de una rotura de doble cadena en la secuencia diana. Una rotura de doble cadena en el ADN recluta posteriormente maquinaria de reparación endógena en el lugar de la rotura para mediar en la edición del genoma mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la reparación dirigida por homología (HDR). Así, la reparación de la rotura puede dar lugar a la introducción de mutaciones de inserción/deleción que alteran *(por ejemplo*, silencian, reprimen o potencian) el producto génico diana.

[0919] Las principales clases de nucleasas que se han desarrollado para permitir la edición genómica de sitios específicos incluyen nucleasas de dedos de zinc (ZFNs), nucleasas similares a activadores de transcripción (TALENs), y nucleasas asociadas a CRISPR (por ejemplo, CRISPR/Cas9). Estos sistemas de nucleasas pueden clasificarse a grandes rasgos en dos categorías en función de su modo de reconocimiento del ADN: Las ZFN y las TALEN se unen específicamente al ADN mediante interacciones proteína-ADN, mientras que los sistemas CRISPR, como Cas9, se dirigen a secuencias de ADN específicas mediante una molécula guía de ARN corta que se empareja directamente con el ADN diana y mediante interacciones proteína-ADN. *Véase, por ejemplo,* Cox et al., Nature Medicine, 2015, vol. 21, n.º 2.

[0920] Ejemplos no limitantes de métodos de edición de genes que pueden usarse de acuerdo con los métodos de expansión de TIL de la presente invención incluyen métodos CRISPR, métodos TALE y métodos ZFN, que se describen con más detalle a continuación. De acuerdo con una realización, un método para expandir los TIL en una población terapéutica puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquier realización de los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, proceso GEN 3) o como se describe en PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605, o PCT/US2018/012633, donde el método comprende además editar genéticamente al menos una porción de los TIL mediante uno o más de un método CRISPR, un método TALE o un método ZFN, con el fin de generar TIL que puedan proporcionar un efecto terapéutico mejorado. Según una realización, los TIL editados genéticamente pueden evaluarse para un efecto terapéutico mejorado comparándolas con los TIL no modificados *in vitro, por ejemplo,* evaluando la función efectora *in vitro*, los perfiles de citocinas, etc. en comparación con los TIL no modificados. En ciertas realizaciones, el método comprende la edición génica de una población de TILs utilizando métodos CRISPR, TALE y/o ZFN.

[0921] **En** algunas realizaciones de la presente invención, la electroporación se utiliza para la entrega de un sistema de edición de genes, como los sistemas CRISPR, TALEN, y ZFN. En algunas realizaciones de la presente invención, el sistema de electroporación es un sistema de electroporación en flujo. Un ejemplo de un sistema de electroporación por flujo adecuado para su uso con algunas realizaciones de la presente invención es el sistema MaxCyte STX disponible comercialmente. Existen varios instrumentos de electroporación alternativos disponibles comercialmente que pueden ser adecuados para su uso con la presente invención, como el sistema AgilePulse o ECM 830 disponible en BTX-Harvard Apparatus, Cellaxess Elektra (Cellectricon), Nucleofector (Lonza/Amaxa), GenePulser MXcell (BIORAD), iPorator-96 (Primax) o siPORTer96 (Ambion). En algunas realizaciones de la presente invención, el sistema de electroporación forma un sistema cerrado y estéril con el resto del método de expansión de TIL. En algunas realizaciones de la presente invención, el sistema de electroporación es un sistema de electroporación pulsada como se describe en el presente

documento, y forma un sistema cerrado y estéril con el resto del método de expansión de TIL.

[0922] Un método para expandir los TIL en una población terapéutica puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquier realización de los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, proceso GEN 3) o como se describe en PCT/US2017/058610 (WO2018/081473), PCT/US2018/012605 (WO2018/129332), o PCT/US2018/012633 (WO2018/182817), en el que el método comprende además editar genéticamente al menos una porción de los TIL mediante un método CRISPR (*por ejemplo*, CRISPR/Cas9 o CRISPR/Cpf1). Según realizaciones particulares, el uso de un método CRISPR durante el proceso de expansión de TIL hace que la expresión de uno o más genes de punto de control inmunitario se silencie o reduzca en al menos una parte de la población terapéutica de TIL. Alternativamente, el uso de un método CRISPR durante el proceso de expansión de TIL hace que la expresión de uno o más genes de punto de control inmunitario se potencie en al menos una parte de la población terapéutica de TIL.

[0923] CRISPR significa "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats". Un método de uso de un sistema CRISPR para la edición de genes también se denomina en el presente documento método CRISPR. Existen tres tipos de sistemas CRISPR que incorporan ARN y proteínas Cas, y que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención: Tipos I, II, y III. El CRISPR de tipo II (ejemplificado por Cas9) es uno de los sistemas mejor caracterizados.

[0924] La tecnología CRISPR se adaptó a partir de los mecanismos de defensa naturales de bacterias y arqueas (el dominio de los microorganismos unicelulares). Estos organismos utilizan ARN derivado de CRISPR y varias proteínas Cas, incluida Cas9, para frustrar los ataques de virus y otros cuerpos extraños troceando y destruyendo el ADN de un invasor extraño. Una CRISPR es una región especializada de ADN con dos características distintas: la presencia de repeticiones de nucleótidos y de espaciadores. Las secuencias repetidas de nucleótidos se distribuyen a lo largo de una región CRISPR con segmentos cortos de ADN extraño (espaciadores) intercalados entre las secuencias repetidas. En el sistema CRISPR/Cas de tipo II, los espaciadores se integran dentro de los loci genómicos CRISPR y se transcriben y procesan en ARN CRISPR corto (ARNcr). Estos ARNcr se unen a los ARNcr transactivadores (ARNcrtra) y dirigen el corte y silenciamiento del ADN patógeno por las proteínas Cas. El reconocimiento de la diana por parte de la proteína Cas9 requiere una secuencia "semilla" dentro del ARNcr y una secuencia conservada con dinucleótidos que contenga un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) antes de la región de unión al ARNcr. De este modo, el sistema CRISPR/Cas puede reorientarse para cortar prácticamente cualquier secuencia de ADN rediseñando el ARNcr. El ARNcr y el ARNtracr en el sistema nativo pueden simplificarse en un único ARN guía (ARNsg) de aproximadamente 100 nucleótidos para su uso en ingeniería genética. El sistema CRISPR/Cas es directamente portable a las células humanas mediante la codelivery de plásmidos que expresan la endo-nucleasa Cas9 y los componentes necesarios del ARNcr. Se pueden utilizar diferentes variantes de las proteínas Cas para reducir las limitaciones de orientación (por ejemplo, ortólogos de Cas9, como Cpf1).

[0925] Ejemplos no limitantes de genes que pueden silenciarse o inhibirse mediante edición génica permanente de TILs a través de un método CRISPR incluyen PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, y GUCY1B3.

[0926] Ejemplos no limitantes de genes que pueden mejorarse editando permanentemente genéticamente TILs mediante un método CRISPR incluyen CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15, e IL-21.

[0927] Ejemplos de sistemas, métodos y composiciones para alterar la expresión de una secuencia génica diana mediante un método CRISPR, y que pueden utilizarse de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, se describen en Patentes de EE.UU. N.º 8,697,359; 8,993,233; 8,795,965; 8,771,945; 8,889,356; 8,865,406; 8,999,641; 8,945,839; 8,932,814; 8,871,445; 8,906,616; y 8,895,308. Los recursos para llevar a cabo los métodos CRISPR, como los plásmidos para expresar CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cpf1, están disponibles comercialmente en empresas como GenScript.

[0928] En una realización, las modificaciones genéticas de poblaciones de TILs, como se describe en el presente documento, pueden llevarse a cabo utilizando el sistema CRISPR/Cpfl como se describe en Patente de EE.UU. n.º US 9790490.

[0929] Un método para expandir los TIL en una población terapéutica puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquier realización de los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, el proceso 2A) o como se describe en PCT/US2017/058610 (WO2018/081473), PCT/US2018/012605 (WO2018/129332), o PCT/US2018/012633 (WO2018/182817), donde el método comprende además la edición génica de al menos una parte de los TIL mediante un método TALE. Según realizaciones particulares, el uso de un método TALE durante el proceso de expansión de TIL hace que la expresión de uno o más genes de punto de control inmunitario se silencie o reduzca en al menos una parte de la población terapéutica de TIL. Alternativamente, el uso de un método TALE durante el proceso de expansión de TIL hace que la expresión de uno o más genes de punto de control inmunitario se potencie en al menos una parte de la población terapéutica de TIL.

[0930] TALE significa proteínas "Transcription Activator-Like Effector", que incluyen TALENs ("Transcription Activator-Like

Effector Nucleases"). Un método de utilización de un sistema TALE para la edición de genes también puede denominarse en el presente documento método TALE. Los TALE son proteínas naturales de las bacterias fitopatógenas del género *Xanthomonas* y contienen dominios de unión al ADN compuestos por una serie de dominios repetidos de 33-35 aminoácidos que reconocen cada uno un único par de bases. La especificidad de TALE viene determinada por dos aminoácidos hipervariables que se conocen como di-residuos de repetición variable (RVD). Las repeticiones modulares TALE están unidas entre sí para reconocer secuencias contiguas de ADN. Un RVD específico en el dominio de unión al ADN reconoce una base en el locus diana, proporcionando una característica estructural para ensamblar dominios de unión al ADN predecibles. Los dominios de unión al ADN de uno TALE se fusionan con el dominio catalítico de una endonucleasa FokI de tipo IIS para crear una nucleasa TALE seleccionable. Para inducir la mutación específica del sitio, dos brazos TALEN individuales, separados por una región espaciadora de 14-20 pares de bases, acercan los monómeros FokI para que dimericen y produzcan una rotura de doble cadena.

[0931] Varios estudios amplios y sistemáticos que utilizan varios métodos de ensamblaje han indicado que las repeticiones TALE pueden combinarse para reconocer virtualmente cualquier secuencia definida por el usuario. Las matrices TALE diseñadas a medida también están disponibles comercialmente a través de Cellectis Bioresearch (París, Francia), Transposagen Biopharmaceuticals (Lexington, KY, EE.UU.) y Life Technologies (Grand Island, NY, EE.UU.). Los métodos TALE y TALEN adecuados para su uso en la presente invención se describen en Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. US 2011/0201118 A1; US 2013/0117869A1; US 2013/0315884A1; US 2015/0203871 A1 y US 2016/0120906 A1.

[0932] Ejemplos no limitantes de genes que pueden silenciarse o inhibirse mediante edición génica permanente de TILs a través de un método TALE incluyen PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, y GUCY1B3.

[0933] Ejemplos no limitantes de genes que pueden mejorarse mediante la edición genética permanente de TILs a través de un método TALE incluyen CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15, e IL-21.

[0934] Ejemplos de sistemas, métodos, y composiciones para alterar la expresión de una secuencia génica diana mediante un método TALE, y que pueden utilizarse de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, se describen en Patente de EE. UU. N.º 8,586,526.

[0935] Un método para expandir los TIL en una población terapéutica puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquier realización de los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, proceso GEN 3) o como se describe en PCT/US2017/058610 (WO2018/081473), PCT/US2018/012605 (WO2018/129332), o PCT/US2018/012633 (WO2018/182817), donde el método comprende además la edición génica de al menos una porción de los TIL mediante un método de dedo de zinc o nucleasa de dedo de zinc. Según realizaciones particulares, el uso de un método de dedos de zinc durante el proceso de expansión de TIL hace que la expresión de uno o más genes de punto de control inmunitario se silencie o reduzca en al menos una parte de la población terapéutica de TIL. Alternativamente, el uso de un método de dedos de zinc durante el proceso de expansión de TIL hace que la expresión de uno o más genes de punto de control inmunitario se potencie en al menos una parte de la población terapéutica de TIL.

[0936] Un dedo de zinc individual contiene aproximadamente 30 aminoácidos en una configuración ββα conservada. Varios aminoácidos de la superficie de la α-hélice suelen entrar en contacto con 3 bp del surco principal del ADN, con distintos niveles de selectividad. Los dedos de zinc tienen dos dominios proteicos. El primer dominio es el de unión al ADN, que incluye factores de transcripción eucarióticos y contiene el dedo de zinc. El segundo dominio es el de la nucleasa, que incluye la enzima de restricción FokI y es responsable de la escisión catalítica del ADN.

[0937] Los dominios de unión al ADN de ZFNs individuales contienen típicamente entre tres y seis repeticiones individuales de dedos de zinc y pueden reconocer cada uno entre 9 y 18 pares de bases. Si los dominios de los dedos de zinc son específicos para el lugar al que se dirigen, entonces incluso un par de ZFN de 3 dedos que reconozcan un total de 18 pares de bases pueden, en teoría, dirigirse a un único locus en el genoma de un mamífero. Un método para generar nuevos conjuntos de dedo de zinc consiste en combinar "módulos" más pequeños de dedo de zinc de especificidad conocida. El proceso de ensamblaje modular más común implica la combinación de tres dedos de zinc separados que pueden reconocer cada uno una secuencia de ADN de 3 pares de bases para generar un conjunto de 3 dedos que puede reconocer un sitio diana de 9 pares de bases. Alternativamente, se pueden utilizar enfoques basados en la selección, como la ingeniería de grupos oligomerizados (OPEN), para seleccionar nuevos conjuntos de dedos de zinc a partir de bibliotecas aleatorias que tengan en cuenta las interacciones dependientes del contexto entre dedos vecinos. Los dedos de zinc de ingeniería están disponibles comercialmente; Sangamo Biosciences (Richmond, CA, EE.UU.) ha desarrollado una plataforma propia (CompoZr®) para la construcción de dedos de zinc en colaboración con Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

[0938] Ejemplos no limitantes de genes que pueden silenciarse o inhibirse mediante edición génica permanente de TILs a través de un método de dedo de zinc incluyen PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B,

PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, y GUCY1B3.

[0939] Ejemplos no limitantes de genes que pueden mejorarse mediante la edición génica permanente de TILs a través de un método de dedo de zinc incluyen CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15, e IL-21.

[0940] Ejemplos de sistemas, métodos y composiciones para alterar la expresión de una secuencia génica diana mediante un método de dedos de zinc, que pueden utilizarse de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, se describen en Patentes de EE.UU. N.º 6,534,261, 6,607,882, 6,746,838, 6,794,136, 6,824,978, 6,866,997, 6,933,113, 6,979,539, 7,013,219, 7,030,215, 7,220,719, 7,241,573, 7,241,574, 7,585,849, 7,595,376, 6,903,185, y 6,479,626.

[0941] Otros ejemplos de sistemas, métodos y composiciones para alterar la expresión de una secuencia génica diana mediante un método de dedos de zinc, que pueden utilizarse de acuerdo con realizaciones de la presente invención, se describen en Beane, et al., Mol. Therapia, 2015, 23 1380-1390.

[0942] En algunas realizaciones, los TIL son opcionalmente modificados genéticamente para incluir funcionalidades adicionales, incluyendo, pero no limitado a, un receptor de células T de alta afinidad (TCR), *por ejemplo,* un TCR dirigido a un antígeno asociado a tumor como MAGE-1, HER2, o NY-ESO-1, o un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a una molécula de superficie celular asociada a tumor (*por ejemplo*, mesotelina) o molécula de superficie celular restringida a linaje (*por ejemplo,* CD19). En ciertas realizaciones, el método comprende la ingeniería genética de una población de TIL para incluir un receptor de células T (TCR) de alta afinidad, por *ejemplo,* un TCR dirigido a un antígeno asociado al tumor como MAGE-1, HER2 o NY-ESO-1, o un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a una molécula de superficie celular asociada al tumor (*por ejemplo*, mesotelina) o a una molécula de superficie celular restringida al linaje (*por ejemplo*, CD19). Apropiadamente, la población de TIL puede ser una primera población, una segunda población y/o una tercera población como se describe en el presente documento.

K. Sistemas Cerrados para la Fabricación de TIL

[0943] La presente invención prevé el uso de sistemas cerrados durante el proceso de cultivo de TIL. Estos sistemas cerrados permiten prevenir y/o reducir la contaminación microbiana, utilizar menos matraces y reducir costes. En algunas realizaciones, el sistema cerrado utiliza dos contenedores.

[0944] Tales sistemas cerrados son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm y https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.

[0945] Los dispositivos de conexión estériles (STCD) producen soldaduras estériles entre dos piezas de tubos compatibles. Este procedimiento permite la conexión estéril de diversos recipientes y diámetros de tubo. En algunas realizaciones, los sistemas cerrados incluyen sistemas luer lock y termosellados como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo G. En algunas realizaciones, se accede al sistema cerrado mediante jeringas en condiciones estériles para mantener la esterilidad y la naturaleza cerrada del sistema. En algunas realizaciones, se emplea un sistema cerrado como el descrito en el Ejemplo G. En algunas realizaciones, los TIL se formulan en un recipiente de formulación final del producto según el método descrito en el Ejemplo G, sección "Formulación final y llenado".

[0946] En algunas realizaciones, el sistema cerrado utiliza un contenedor desde el momento en que se obtienen los fragmentos tumorales hasta que los TIL están listos para su administración al paciente o su crioconservación. En algunas realizaciones cuando se utilizan dos contenedores, el primer contenedor es un contenedor G cerrado y la población de TILs se centrifuga y se transfiere a una bolsa de infusión sin abrir el primer contenedor G cerrado. En algunas realizaciones, cuando se utilizan dos contenedores, la bolsa de infusión es una bolsa de infusión que contiene HypoThermosol. Un sistema cerrado o sistema cerrado de cultura de células TIL se caracteriza porque una vez que se ha añadido la muestra tumoral y/o los fragmentos tumorales, el sistema se sella herméticamente desde el exterior para formar un entorno cerrado libre de la invasión de bacterias, hongos, y/o cualquier otra contaminación microbiana.

[0947] En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana está comprendida entre aproximadamente 5% y aproximadamente 100%. En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana se sitúa entre aproximadamente 5% y aproximadamente 95%. En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana se sitúa entre aproximadamente 5% y aproximadamente 90%. En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana se sitúa entre aproximadamente 10% y aproximadamente 90%. En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana se sitúa entre aproximadamente 15% y aproximadamente 85%. En algunas realizaciones, la reducción de la contaminación microbiana es de aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, o 100%.

[0948] El sistema cerrado permite el crecimiento de TIL en ausencia y/o con una reducción significativa de la contaminación microbiana.

[0949] Además, el pH, la presión parcial de dióxido de carbono y la presión parcial de oxígeno del entorno de cultivo de células TIL varían a medida que se cultivan las células. Por consiguiente, aunque se haga circular un medio apropiado para la cultura celular, el entorno cerrado debe mantenerse constantemente como un entorno óptimo para la proliferación de TIL. Para ello, es deseable que los factores físicos de pH, presión parcial de dióxido de carbono y presión parcial de oxígeno dentro del líquido de cultivo del entorno cerrado se controlen mediante un sensor, cuya señal se utilice para controlar un intercambiador de gas instalado en la entrada del entorno de cultivo, y que la presión parcial de gas del entorno cerrado se ajuste en tiempo real en función de los cambios en el líquido de cultivo para optimizar el entorno de cultivo celular. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un sistema de cultivo celular cerrado que incorpora en la entrada al entorno cerrado un intercambiador de gases equipado con un dispositivo de monitorización que mide el pH, la presión parcial de dióxido de carbono y la presión parcial de oxígeno del entorno cerrado, y optimiza el entorno de cultivo celular ajustando automáticamente las concentraciones de gas basándose en las señales del dispositivo de monitorización.

[0950] En algunas realizaciones, la presión dentro del ambiente cerrado es controlada continua o intermitentemente. Es decir, la presión en el entorno cerrado puede variarse mediante un dispositivo de mantenimiento de la presión, por ejemplo, garantizando así que el espacio sea adecuado para el crecimiento de los TIL en un estado de presión positiva, o promoviendo la exudación de fluido en un estado de presión negativa y promoviendo así la proliferación celular. Además, aplicando presión negativa de forma intermitente, es posible sustituir de forma uniforme y eficaz el líquido circulante en el entorno cerrado mediante una contracción temporal del volumen del entorno cerrado.

[0951] En algunas realizaciones, los componentes de cultivo óptimos para la proliferación de los TIL pueden ser sustituidos o añadidos, e incluyendo factores tales como IL-2 y/o OKT3, así como la combinación, pueden ser añadidos.

L. Criopreservación Opcional de TILs

[0952] La población de TIL en masa (por ejemplo, la segunda población de TIL) o la población expandida de TIL (por ejemplo, la tercera población de TIL) pueden criopreservarse opcionalmente. En algunas realizaciones, la criopreservación tiene lugar en la población terapéutica de TIL. En algunas realizaciones, la criopreservación se produce en los TIL recolecciónds después de la segunda expansión. En algunas realizaciones, la criopreservación tiene lugar en los TIL en la Etapa F ejemplar de la Figura 8 (en particular, *p. ej.,* la Figura 8B y/o la Figura 8C). En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan en la bolsa de infusión. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan antes de colocarlos en una bolsa de infusión. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan y no se colocan en una bolsa de infusión. En algunas realizaciones, la criopreservación se lleva a cabo utilizando un medio de criopreservación. En algunas realizaciones, el medio de criopreservación contiene dimetilsulfóxido (DMSO). Esto se consigue generalmente poniendo la población de TIL en una solución de congelación, *p. ej.* 85% de suero AB inactivado del complemento y 15% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las células en solución se colocan en viales criogénicos y se almacenan durante 24 horas a -80 °C, con transferencia opcional a congeladores de nitrógeno gaseoso para su criopreservación. See, Sadeghi, et al.,.

[0953] Cuando sea apropiado, las células son removidas del congelador y descongeladas en un baño de agua a 37 °C hasta que aproximadamente 4/5 de la solución esté descongelada. Por lo general, las células se resuspenden en medios completos y, opcionalmente, se lavan una o más veces. En algunas realizaciones, los TIL descongelados pueden contarse y evaluarse para determinar su viabilidad como se conoce en la técnica.

[0954] En una realización preferida, una población de TIL es criopreservada usando el medio de criopreservación CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). En una realización preferida, una población de TILs se criopreserva utilizando un medio de criopreservación que contiene dimetilsulfóxido (DMSO). En una realización preferida, una población de TIL se criopreserva utilizando una proporción 1:1 (vol:vol) de CS10 y medio de cultura celular. En una realización preferida, una población de TIL se criopreserva utilizando una proporción de aproximadamente 1:1 (vol:vol) de CS10 y medio de cultura celular, que comprende además IL-2 adicional.

[0955] Como se discutió anteriormente, y ejemplificado en las Etapas A a E como se proporciona en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C), la criopreservación puede ocurrir en numerosos puntos a lo largo del proceso de expansión de TIL. En algunas realizaciones, la población expandida de TIL después de la segunda expansión (como se proporciona, por ejemplo, según la Etapa D de la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C) puede criopreservarse. La criopreservación puede realizarse generalmente colocando la población de TIL en una solución de congelación, *por ejemplo,* 85% de suero AB inactivado con complemento y 15% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las células en solución se colocan en viales criogénicos y se almacenan durante 24 horas a -80 °C, con transferencia opcional a congeladores de nitrógeno gaseoso para su criopreservación. Véase Sadeghi, et al.,. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan en DMSO al 5%. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan en medios de cultura celular más 5% de DMSO. En algunas realizaciones, los TIL se criopreservan de acuerdo con los métodos proporcionados en el Ejemplo D.

[0956] Cuando sea apropiado, las células son removidas del congelador y descongeladas en un baño de agua a 37 °C

hasta que aproximadamente 4/5 de la solución esté descongelada. Por lo general, las células se resuspenden en medios completos y, opcionalmente, se lavan una o más veces. En algunas realizaciones, los TIL descongelados pueden contarse y evaluarse para determinar su viabilidad como se conoce en la técnica.

[0957] En algunos casos, la población TIL de la Etapa B puede ser criopreservada inmediatamente, usando los protocolos discutidos abajo. Alternativamente, la población de TIL a granel puede someterse al Etapa C y al Etapa D y luego criopreservarse después de la Etapa D. De manera similar, en el caso en que los TIL modificados genéticamente se utilizarán en terapia, las poblaciones de TIL de la Etapa B o de la Etapa D pueden someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados.

M. Características fenotípicas de los TIL expandidos

[0958] En alguna realización, los TIL se analizan para la expresión de numerosos marcadores de fenotipo después de la expansión, incluidos los descritos en el presente documento y en los Ejemplos. En una realización, se examina la expresión de uno o más marcadores fenotípicos. En algunas realizaciones, las características fenotípicas de los TIL se analizan después de la primera expansión en la Etapa B. En algunas realizaciones, las características fenotípicas de los TIL se analizan durante la transición en la Etapa C. En algunas realizaciones, las características fenotípicas de los TIL se analizan durante la transición según la Etapa C y después de la criopreservación. En algunas realizaciones, las características fenotípicas de los TIL se analizan después de la segunda expansión según la Etapa D. En algunas realizaciones, las características fenotípicas de los TIL se analizan después de dos o más expansiones según la Etapa D.

[0959] En algunas realizaciones, el marcador se selecciona del grupo que consiste en CD8 y CD28. En algunas realizaciones, se examina la expresión de CD8. En algunas realizaciones, se examina la expresión de CD28. En algunas realizaciones, la expresión de CD8 y/o CD28 es mayor en los TIL producidos según el proceso de la presente invención, en comparación con otros procesos (*por ejemplo*, el proceso Gen 3 como se proporciona por ejemplo en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C), en comparación con el proceso 2A como se proporciona por ejemplo en la Figura 8 (en particular, por ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C). En algunas realizaciones, la expresión de CD8 es mayor en los TIL producidos según el proceso de la presente invención, en comparación con otros procesos (*por ejemplo*, el proceso Gen 3 proporcionado por ejemplo en la Figura 8 (en particular, por *ejemplo*, la Figura 8B), en comparación con el proceso 2A proporcionado por ejemplo en la Figura 8 (en particular, por *ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C). En algunas realizaciones, la expresión de CD28 es mayor en TILs producidos según el proceso de la presente invención, en comparación con otros procesos (*por ejemplo*, el proceso Gen 3 como se proporciona por ejemplo en la Figura 8 (en particular, *por* ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C), en comparación con el proceso 2A como se proporciona por ejemplo en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8A)). En algunas realizaciones, la expresión elevada de CD28 es indicativa de un fenotipo de TIL más joven y presisitente. En una realización, se mide la expresión de uno o más marcadores reguladores.

[0960] En una realización, no se realiza ninguna selección de la primera población de TILs, segunda población de TILs, tercera población de TILs, o población de TIL recoleccióndonda basada en la expresión de CD8 y/o CD28 durante cualquiera de las etapas para el método para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) descritos aquí.

[0961] En algunas realizaciones, el porcentaje de células de memoria central es mayor en TILs producidas según el proceso de la invención actual, en comparación con otros procesos (*por ejemplo*, el proceso Gen 3 como se proporciona por ejemplo en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C), en comparación con el proceso 2A como se proporciona por ejemplo en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8A)). En algunas realizaciones, el marcador de memoria para las células centrales de memoria se selecciona del grupo formado por CCR7 y CD62L.

[0962] En algunas realizaciones, los subconjuntos de memoria TIL CD4+ y/o CD8+ pueden dividirse en diferentes subconjuntos de memoria. En algunas realizaciones, los TIL CD4+ y/o CD8+ comprenden los TIL naïve (CD45RA+CD62L+). En algunas realizaciones, los TIL CD4+ y/o CD8+ comprenden los TIL de memoria central (CM; CD45RA-CD62L+). En algunas realizaciones, los TIL CD4+ y/o CD8+ comprenden los TIL de memoria efectora (EM; CD45RA-CD62L-). En algunas realizaciones, los TIL CD4+ y/o CD8+ comprenden los TIL de memoria/efectores de AR+ (TEMRA/TEFF; CD45RA+CD62L+).

[0963] En algunas realizaciones, los TIL expresan uno más marcadores seleccionados del grupo que consiste en granzima B, perforina y granulisina. En algunas realizaciones, los TIL expresan granzima B. En algunas realizaciones, los TIL expresan perforina. En algunas realizaciones, los TIL expresan granulisina.

[0964] En una realización, los TIL reestimulados también pueden evaluarse para la liberación de citoquinas, utilizando ensayos de liberación de citoquinas. En algunas realizaciones, los TIL pueden evaluarse para la secreción de interferón-γ (IFN-γ). En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ se mide mediante un ensayo ELISA. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ se mide mediante un ensayo ELISA después de la segunda etapa de expansión rápida, después de la Etapa D, como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 8 (en particular, por *ejemplo*, en la Figura 8B y/o la Figura 8C). En algunas realizaciones, la salud de los TIL se mide por la secreción de IFN-gamma (IFN-γ). En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ es indicativa de TIL activos. En algunas realizaciones, se emplea un ensayo de potencia para la producción de IFN-γ. La producción de IFN-γ es otra medida del potencial citotóxico. La producción de

IFN-γ puede medirse determinando los niveles de la citocina IFN-γ en los medios de TIL estimulados con anticuerpos frente a CD3, CD28 y CD137/4-1BB. Los niveles de IFN-γ en el medio de estos TIL estimulados pueden determinarse midiendo la liberación de IFN-γ. En algunas realizaciones, un aumento en la producción de IFN-γ en, por ejemplo, la Etapa D en el proceso Gen 3 tal como se proporciona en la Figura 8 (en particular, *por* ejemplo, la Figura 8B y/o la Figura 8C) TIL en comparación con, por ejemplo, la Etapa D en el proceso 2A tal como se proporciona en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8A) es indicativo de un aumento en el potencial citotóxico de los TIL de la Etapa D. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ aumenta una, dos, tres, cuatro, o cinco veces o más. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ se multiplica por uno. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ se multiplica por dos. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ se triplica. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ se multiplica por cuatro. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ se multiplica por cinco. En algunas realizaciones, el IFN-γ se mide utilizando un kit Quantikine ELISA. En algunas realizaciones, el IFN-γ se mide en TIL *ex vivo.* En algunas realizaciones, el IFN-γ se mide en los TIL *ex vivo,* incluidos los TIL producidos por los métodos de la presente invención, incluidos, por ejemplo, los métodos de la Figura 8B.

[0965] En algunas realizaciones, los TIL capaces de al menos una, dos, tres, cuatro, o cinco veces o más secreción de IFN-γ son TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, los métodos de la Figura 8B y/o la Figura 8C. En algunas realizaciones, los TIL capaces de secretar al menos una vez más IFN-γ son TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, los métodos de la Figura 8B y/o la Figura 8C. En algunas realizaciones, los TIL capaces de secretar al menos dos veces más IFN-γ son TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, los métodos de la Figura 8B y/o la Figura 8C. En algunas realizaciones, los TIL capaces de secretar al menos tres veces más IFN-γ son TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, los métodos de la Figura 8B y/o la Figura 8C. En algunas realizaciones, los TIL capaces de secretar al menos cuatro veces más IFN-γ son TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, los métodos de la Figura 8B y/o la Figura 8C. En algunas realizaciones, los TIL capaces de secretar al menos cinco veces más IFN-γ son TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, incluidos, por ejemplo, los métodos de la Figura 8B y/o la Figura 8C.

[0966] Los diversos receptores de antígenos de los linfocitos T y B se producen por recombinación somática de un número limitado, pero grande, de segmentos génicos. Estos segmentos de genes: V (variable), D (diversidad), J (unión), y C (constante), determinan la especificidad de unión y las aplicaciones posteriores de las inmunoglobulinas y los receptores de células T (TCR). La presente invención proporciona un método para generar TILs que exhiben y aumentan la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, los TIL obtenidos por el presente método muestran un aumento de la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, las células TIL obtenidas por el presente método muestran un aumento en la diversidad del repertorio de células T en comparación con las células TIL recién recolecciónd as y/o las células TIL preparadas usando otros métodos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, métodos distintos de los representados en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C). En algunas realizaciones, los TIL obtenidos por el presente método muestran un aumento en la diversidad del repertorio de células T en comparación con los TIL recién recolecciónd os y/o los TIL preparados usando métodos a los que se hace referencia como proceso 2A, como se ejemplifica en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8A). En algunas realizaciones, las células TIL obtenidas en la primera expansión muestran un aumento de la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, el aumento de la diversidad es un aumento de la diversidad de inmunoglobulinas y/o de la diversidad de receptores de células T. En algunas realizaciones, la diversidad está en la inmunoglobulina está en la cadena pesada de la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la diversidad está en la inmunoglobulina está en la cadena ligera de la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la diversidad está en el receptor de células T. En algunas realizaciones, la diversidad está en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma, y delta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) alfa. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas realizaciones, se produce un aumento de la expresión de TCRab *(es decir,* TCRα/β). En algunas realizaciones, el proceso descrito en el presente documento *(por* ejemplo, el proceso Gen 3) muestra una mayor diversidad clonal en comparación con otros procesos, por ejemplo el proceso denominado Gen 2 basado en el número de CDR peptídicas únicas dentro de la muestra *(véanse*, por ejemplo, las Figuras 12-14).

[0967] En algunas realizaciones, la activación y el agotamiento de TILs pueden determinarse examinando uno o más marcadores. En algunas realizaciones, la activación y el agotamiento pueden determinarse mediante citometría de flujo multicolor. En algunas realizaciones, la activación y el agotamiento de marcadores incluyen pero no se limitan a uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD3, PD-1, 2B4/CD244, CD8, CD25, BTLA, KLRG, TIM-3, CD194/CCR4, CD4, TIGIT, CD183, CD69, CD95, CD127, CD103, y/o LAG-3). En algunas realizaciones, la activación y el agotamiento de marcadores incluyen, entre otros, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en BTLA, CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, PD-1, TIGIT, y/o TIM-3. En algunas realizaciones, la activación y el agotamiento de marcadores incluyen pero no se limitan a uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en BTLA, CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, CD103+/CD69+, CD103+/CD69-, PD-1, TIGIT, y/o TIM-3. En algunas realizaciones, los marcadores de células T (incluidos los marcadores de activación y agotamiento) pueden determinarse y/o analizarse para examinar la activación, inhibición o función de las células T. En algunas realizaciones, los marcadores de células T pueden incluir, entre otros, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en TIGIT, CD3, FoxP3, Tim-3, PD-1, CD103, CTLA-4, LAG-3, BTLA-4, ICOS, Ki67, CD8, CD25, CD45, CD4, y/o CD59.

[0968] En algunas realizaciones, la caracterización fenotípica se examina después de la criopreservación.

M. Otras realizaciones del proceso

[0969] En el presente documento se describe un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: (a) obtener una primera población de TILs de un tumor resecado de un sujeto procesando una muestra de tumor obtenida del sujeto en múltiples fragmentos de tumor; (b) realizar una primera expansión de cebado cultivando la primera población de TILs en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y OKT-3, en el que la primera expansión de cebado se realiza durante aproximadamente 1 a 7 días o aproximadamente 1 a 8 días para obtener la segunda población de TILs, donde la segunda población de TILs es mayor en número que la primera población de TILs; (c) realizar una segunda expansión rápida poniendo en contacto la segunda población de TILs con un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno exógenas (APCs) para producir una tercera población de TILs, donde la segunda expansión rápida se realiza durante aproximadamente 1 a 11 días o aproximadamente 1 a 10 días para obtener la tercera población de TILs, donde la tercera población de TILs es una población terapéutica de TILs; y (d) recolecciónr la población terapéutica de TILs obtenida de la etapa (c).

[0970] La Etapa de la segunda expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr una ampliación del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, por ejemplo, un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, o de aproximadamente 2 a 4 días, y a continuación (2) efectuar la transferencia de la segunda población de TIL del cultivo a pequeña escala a un segundo contenedor mayor que el primer contenedor, por ejemplo, un contenedor G-REX 500MCS, donde en el segundo contenedor la segunda población de TILs del cultivo a pequeña escala se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de aproximadamente 4 a 7 días, o de aproximadamente 4 a 8 días. La Etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr un escalado del cultivo mediante: (1) llevar a cabo la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un primer cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, p. ej, un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, y a continuación (2) efectuar la transferencia y reparto de la segunda población de TIL desde el primer cultivo a pequeña escala a y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos recipientes de igual tamaño que el primer recipiente, en los que en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala durante un periodo de aproximadamente 4 a 7 días, o de aproximadamente 4 a 8 días. La Etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr una ampliación y una ampliación del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, p. ej., un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, o de aproximadamente 2 a 4 días, y a continuación (2) efectuar la transferencia y el reparto de la segunda población de TIL desde el primer cultivo a pequeña escala a y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos contenedores que son de mayor tamaño que el primer contenedor, por ejemplo, contenedores G-REX 500MCS, en los que en cada segundo contenedor la porción de la segunda población de TILs transferida desde el cultivo a pequeña escala a dicho segundo contenedor se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de aproximadamente 4 a 7 días, o de aproximadamente 4 a 8 días. La Etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr una ampliación y una ampliación del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y luego (2) efectuar la transferencia y repartición de la segunda población de TIL desde el primer cultivo a pequeña escala hacia y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL transferida desde el cultivo a pequeña escala a dicho segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 5 a 7 días.

[0971] En el presente documento se describe un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: (a) obtener una primera población de TILs a partir de un tumor resecado de un sujeto procesando una muestra de tumor obtenida del sujeto en múltiples fragmentos de tumor; (b) realizar una primera expansión de cebado cultivando la primera población de TILs en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y OKT-3, en donde la primera expansión de cebado se realiza durante aproximadamente 1 a 8 días para obtener la segunda población de TILs, en donde la segunda población de TILs es mayor en número que la primera población de TILs; (c) realizar una segunda expansión rápida poniendo en contacto la segunda población de TILs con un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno exógenas (APCs) para producir una tercera población de TILs, donde la segunda expansión rápida se realiza durante aproximadamente 1 a 8 días para obtener la tercera población de TILs, donde la tercera población de TILs es una población terapéutica de TILs; y (d) recolecciónr la población terapéutica de TILs obtenida de la etapa (c). La Etapa de la segunda expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr un escalado del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, *por ejemplo*, un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 2 a 4 días, y a continuación (2) efectuar la transferencia de la segunda población de TIL desde el cultivo a pequeña escala a un segundo contenedor mayor que el primer contenedor, por ejemplo, un contenedor G-REX 500MCS, donde en el segundo contenedor la segunda población de TILs del cultivo a pequeña escala se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de aproximadamente 4 a 8 días. La Etapa de expansión rápida

puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr un escalado del cultivo mediante: (1) llevar a cabo la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un primer cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, *p. ej,* un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 2 a 4 días, y a continuación (2) efectuar la transferencia y reparto de la segunda población de TIL desde el primer cultivo a pequeña escala a y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos recipientes de igual tamaño que el primer recipiente, en los que en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala durante un periodo de aproximadamente 4 a 6 días. La Etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr una ampliación y una ampliación del cultivo mediante: (1) llevar a cabo la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, *p. ej,* un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 2 a 4 días, y a continuación (2) efectuar la transferencia y el reparto de la segunda población de TIL desde el primer cultivo a pequeña escala a y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos contenedores de mayor tamaño que el primer contenedor, *por ejemplo* contenedores G-REX 500MCS, en los que en cada segundo contenedor la porción de la segunda población de TILs transferida desde el cultivo a pequeña escala a dicho segundo contenedor se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de aproximadamente 4 a 6 días. La Etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr una ampliación y una ampliación del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y luego (2) efectuar la transferencia y repartición de la segunda población de TIL desde el primer cultivo a pequeña escala hacia y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL transferida desde el cultivo a pequeña escala a dicho segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 4 a 5 días.

[0972] En el presente documento se describe un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: (a) obtener una primera población de TILs a partir de un tumor resecado de un sujeto procesando una muestra de tumor obtenida del sujeto en múltiples fragmentos de tumor; (b) realizar una primera expansión de cebado cultivando la primera población de TILs en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y OKT-3, en donde la primera expansión de cebado se realiza durante aproximadamente 1 a 7 días para obtener la segunda población de TILs, en donde la segunda población de TILs es mayor en número que la primera población de TILs; (c) realizar una segunda expansión rápida poniendo en contacto la segunda población de TILs con un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno exógenas (APCs) para producir una tercera población de TILs, donde la segunda expansión rápida se realiza durante aproximadamente 1 a 11 días para obtener la tercera población de TILs, donde la tercera población de TILs es una población terapéutica de TILs; y (d) recolecciónr la población terapéutica de TILs obtenida de la etapa (c). La Etapa de la segunda expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr un escalado del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, *por ejemplo*, un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, y a continuación (2) efectuar la transferencia de la segunda población de TIL desde el cultivo a pequeña escala a un segundo contenedor mayor que el primer contenedor, *por ejemplo*, un contenedor G-REX 500MCS, donde en el segundo contenedor la segunda población de TILs del cultivo a pequeña escala se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de aproximadamente 4 a 7 días. La Etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr un escalado del cultivo mediante: (1) llevar a cabo la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un primer cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, *p. ej,* un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, y a continuación (2) efectuar la transferencia y reparto de la segunda población de TIL desde el primer cultivo a pequeña escala a y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos recipientes de igual tamaño que el primer recipiente, en los que en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala durante un periodo de aproximadamente 4 a 7 días. La Etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr una ampliación y una ampliación del cultivo mediante: (1) llevar a cabo la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, *p. ej,* un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, y a continuación (2) efectuar la transferencia y el reparto de la segunda población de TIL desde el primer cultivo a pequeña escala a y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos contenedores de mayor tamaño que el primer contenedor, *por ejemplo* contenedores G-REX 500MCS, en los que en cada segundo contenedor la porción de la segunda población de TILs transferida desde el cultivo a pequeña escala a dicho segundo contenedor se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de aproximadamente 4 a 7 días. La Etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr una ampliación y una ampliación del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida cultivando la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 4 días, y luego (2) efectuar la transferencia y repartición de la segunda población de TIL desde el primer cultivo a pequeña escala hacia y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL transferida desde el cultivo a pequeña escala a dicho segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 5 días.

[0973] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables

modificados anteriormente de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza poniendo en contacto la primera población de TILs con un medio de cultivo que comprende además células presentadoras de antígeno (APCs) exógenas, en el que el número de APCs en el medio de cultivo en la etapa (c) es mayor que el número de APCs en el medio de cultivo en la etapa (b).

[0974] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (c) el medio de cultivo se complementa con APC exógenas adicionales.

[0975] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 20:1 aproximadamente.

[0976] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 10:1 aproximadamente.

[0977] Se divulga en el presente documento el método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 9:1 aproximadamente.

[0978] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 8:1 aproximadamente.

[0979] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 7:1 aproximadamente.

[0980] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 6:1 aproximadamente.

[0981] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 5:1 aproximadamente.

[0982] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 4:1 aproximadamente.

[0983] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 3:1 aproximadamente.

[0984] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.9:1 aproximadamente.

[0985] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.8:1 aproximadamente.

[0986] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.7:1 aproximadamente.

[0987] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.6:1 aproximadamente.

[0988] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.5:1 aproximadamente.

[0989] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.4:1 aproximadamente.

[0990] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.3:1 aproximadamente.

[0991] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.2:1 aproximadamente.

[0992] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2.1:1 aproximadamente.

[0993] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 1,1:1 y 2:1 aproximadamente.

[0994] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 10:1 aproximadamente.

[0995] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 5:1 aproximadamente.

[0996] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 4:1 aproximadamente.

[0997] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 3:1 aproximadamente.

[0998] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.9:1 aproximadamente.

[0999] Se divulga en el presente documento el método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.8:1 aproximadamente.

[1000] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.7:1 aproximadamente.

[1001] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.6:1 aproximadamente.

[1002] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.5:1 aproximadamente.

[1003] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.4:1 aproximadamente.

[1004] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.3:1 aproximadamente.

[1005] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según

corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.2:1 aproximadamente.

[1006] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) se selecciona de un intervalo de entre 2:1 y 2.1:1 aproximadamente.

[1007] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) es de 2:1 o aproximadamente.

[1008] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) es de o aproximadamente 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 2:1, 2.1:1, 2.2:1, 2.3:1, 2.4:1, 2.5:1, 2.6:1, 2.7:1, 2.8:1, 2.9:1, 3:1, 3.1:1, 3.2:1, 3.3:1, 3.4:1, 3.5:1, 3.6:1, 3.7:1, 3.8:1, 3.9:1, 4:1, 4.1:1, 4.2:1, 4.3:1, 4.4:1, 4.5:1,4.6:1,4.7:1,4.8:1,4.9:1, o 5:1.

[1009] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que el número de APC añadidos en la primera expansión primaria es de o aproximadamente 1×10^8, 1.1×10^8, 1.2×10^8, 1.3×10^8, 1.4×10^8, 1.5×10^8, 1.6×10^8, 1.7×10^8, $1.8x10^8$, 1.9×10^8, 2×10^8, 2.1×10^8, 2.2×10^8, 2.3×10^8, 2.4×10^8, 2.5×10^8, 2.6×10^8, 2.7×10^8, 2.8×10^8, 2.9×10^8, 3×10^8, 3.1×10^8, 3.2×10^8, 3.3×10^8, 3.4×10^8 o 3.5×10^8 APCs, y de tal manera que el número de APCs añadidos en la segunda expansión rápida sea de o aproximadamente 3.5×10^8, 3.6×10^8, 3.7×10^8, 3.8×10^8, 3.9×10^8, 4×10^8, 4.1×10^8, 4.2×10^8, 4.3×10^8, 4.4×10^8, 4.5×10^8, 4.6×10^8, 4.7×10^8, 4.8×10^8, 4.9×10^8, 5×10^8, 5.1×10^8, 5.2×10^8, 5.3×10^8, 5.4×10^8, 5.5×10^8, 5.6×10^8, 5.7×10^8, 5.8×10^8, 5.9×10^8, 6×10^8, 6.1×10^8, 6.2×10^8, 6.3×10^8, 6.4×10^8, 6.5×10^8, 6.6×10^8, 6.7×10^8, 6.8×10^8, 6.9×10^8, 7×10^8, 7.1×10^8, 7.2×10^8, 7.3×10^8, 7.4×10^8, 7.5×10^8, 7.6×10^8, 7.7×10^8, 7.8×10^8, 7.9×10^8, 8×10^8, 8.1×10^8, 8.2×10^8, 8.3×10^8, 8.4×10^8, 8.5×10^8, 8.6×10^8, 8.7×10^8, 8.8×10^8, 8.9×10^8, 9×10^8, 9.1×10^8, 9.2×10^8, 9.3×10^8, 9.4×10^8, 9.5×10^8, 9.6×10^8, 9.7×10^8, 9.8×10^8, 9.9×10^8 o 1×10^9 APCs.

[1010] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que el número de APC añadidas en la primera expansión primaria se selecciona del intervalo de al menos aproximadamente 1×10^8 APC a al menos aproximadamente $3,5\times10^8$ APC, y en el que el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de al menos aproximadamente $3,5\times10^8$ APC a al menos aproximadamente 1×10^9 APC.

[1011] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que el número de APC añadidas en la primera expansión primaria se selecciona del intervalo de al menos aproximadamente $1,5\times10^8$ APC a al menos aproximadamente 3×10^8 APC, y en el que el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de al menos aproximadamente 4×10^8 APC a al menos aproximadamente $7,5\times10^8$ APC.

[1012] Se **divulga** en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que el número de APC añadidas en la primera expansión primaria se selecciona del intervalo de al menos aproximadamente 2×10^8 APC a al menos aproximadamente $2,5\times10^8$ APC, y en el que el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de al menos aproximadamente $4,5\times10^8$ APC a al menos aproximadamente $5,5\times10^8$ APC.

[1013] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que se añaden al menos $2,5\times10^8$ APC a la primera expansión primaria y al menos 5×10^8 APC a la segunda expansión rápida.

[1014] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables modificados de tal manera que las células presentadoras de antígeno son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

[1015] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que los múltiples fragmentos tumorales se distribuyen en una pluralidad de recipientes separados, en cada uno de los cuales recipientes separados se obtiene la primera población de TIL en la etapa (a), la segunda población de TIL en la etapa (b), y la tercera población de TIL en la etapa (c), y las poblaciones terapéuticas de TIL de la pluralidad de recipientes en la etapa (c) se combinan para producir la población de TIL recolecciónda de la etapa (d).

[1016] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores, según corresponda, modificado de tal manera que los tumores múltiples se distribuyan uniformemente en la pluralidad de recipientes separados.

[1017] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la pluralidad de recipientes separados comprende al menos dos recipientes separados.

[1018] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la pluralidad de recipientes separados comprende de dos a veinte recipientes separados.

[1019] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la pluralidad de recipientes separados comprende de dos a quince recipientes separados.

[1020] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la pluralidad de recipientes separados comprende de dos a diez recipientes separados.

[1021] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la pluralidad de recipientes separados comprende de dos a cinco recipientes separados.

[1022] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la pluralidad de recipientes separados comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 recipientes separados.

[1023] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que para cada recipiente en el que se realiza la primera expansión de cebado sobre una primera población de TILs en la etapa (b) la segunda expansión rápida en la etapa (c) se realiza en el mismo recipiente sobre la segunda población de TILs producida a partir de dicha primera población de TILs.

[1024] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según sea aplicable, modificado de tal manera que cada uno de los recipientes separados comprende una primera área de superficie permeable al gas.

[1025] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que los múltiples fragmentos tumorales se distribuyen en un único recipiente.

[1026] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado de tal manera que el contenedor único comprende una primera área de superficie permeable al gas.

[1027] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable al gas con un grosor medio de al menos una capa celular a al menos tres capas celulares.

[1028] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos aproximadamente 1,5 capas celulares a al menos aproximadamente 2,5 capas celulares.

[1029] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos aproximadamente 2 capas celulares.

[1030] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un espesor promedio de al menos 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, o 3 capas celulares.

[1031] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos aproximadamente 3 capas celulares a al menos aproximadamente 10 capas celulares.

[1032] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos aproximadamente 4 capas celulares a al menos aproximadamente 8 capas celulares.

[1033] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (c) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 capas celulares.

[1034] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (c) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable a los gases a un espesor medio de al menos 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 o 8 capas celulares.

[1035] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión de cebado se realiza en un primer recipiente que comprende una primera área de superficie permeable al gas y en la etapa (c) la segunda expansión rápida se realiza en un segundo recipiente que comprende una segunda área de superficie permeable al gas.

[1036] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores, según corresponda, modificado de tal manera que el segundo recipiente es más grande que el primer recipiente.

[1037] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable al gas con un grosor medio de al menos una capa celular a al menos tres capas celulares.

[1038] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos aproximadamente 1,5 capas celulares a al menos aproximadamente 2,5 capas celulares.

[1039] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos aproximadamente 2 capas celulares.

[1040] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores, modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas en un espesor promedio de al menos 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 o 3 capas celulares.

[1041] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (c) las APC se estratifican sobre la segunda área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos unas 3 capas celulares a al menos unas 10 capas celulares.

[1042] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (c) las APC se estratifican sobre la segunda área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos unas 4 capas celulares a al menos unas 8 capas celulares.

[1043] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la segunda área de superficie permeable al gas con un grosor medio de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 capas celulares.

[1044] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, modificado de tal manera que en la etapa (c) las APC se estratifican sobre la segunda área de superficie permeable a los gases a un grosor medio de al menos 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 o 8 capas celulares.

[1045] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión de cebado se realiza en un primer recipiente que comprende una primera superficie permeable al gas y en la etapa (c) la segunda expansión rápida se realiza en el primer recipiente.

[1046] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable al gas con un grosor medio de al menos una capa celular a al menos tres capas celulares.

[1047] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos aproximadamente 1,5 capas celulares a al menos aproximadamente 2,5 capas celulares.

[1048] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos aproximadamente 2 capas celulares.

[1049] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas en un espesor promedio de al menos 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3 capas celulares.

[1050] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos aproximadamente 3 capas celulares a al menos aproximadamente 10 capas celulares.

[1051] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas a un grosor medio de al menos aproximadamente 4 capas celulares a al menos aproximadamente 8 capas celulares.

[1052] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según sea aplicable, modificado de tal manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor medio de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 capas celulares.

[1053] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (c) las APC se estratifican sobre la primera área de superficie permeable al gas con un espesor promedio de al menos 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 o 8 capas celulares.

[1054] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:10.

[1055] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:9.

[1056] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:8.

[1057] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la

relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:7.

[1058] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:6.

[1059] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:5.

[1060] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:4.

[1061] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:3.

[1062] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:2.

[1063] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,2 a aproximadamente 1:8.

[1064] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,3 a aproximadamente 1:7.

[1065] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,4 a aproximadamente 1:6.

[1066] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1:5.

[1067] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,6 a aproximadamente 1:4.

[1068] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,7 a aproximadamente 1:3.5.

[1069] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,8 a aproximadamente 1:3.

[1070] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1,9 a aproximadamente 1:2.5.

[1071] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:2.

[1072] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza complementando el medio de cultivo celular de la primera población de TILs con células presentadoras de antígeno (APCs) adicionales, en el que el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en el que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas en la etapa (c) se selecciona en el intervalo de aproximadamente 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9, 1:2, 1:2.1, 1:2.2, 1:2.3, 1:2.4, 1:2.5, 1:2.6, 1:2.7, 1:2.8, 1:2.9, 1:3, 1:3.1, 1:3.2, 1:3.3, 1:3.4, 1:3.5, 1:3.6, 1:3.7, 1:3.8, 1:3.9, 1:4, 1:4.1, 1:4.2, 1:4.3, 1:4.4, 1:4.5, 1:4.6, 1:4.7, 1:4.8, 1:4.9, 1:5, 1:5.1, 1:5.2, 1:5.3, 1:5.4, 1:5.5, 1:5.6, 1:5.7, 1:5.8, 1:5.9, 1:6, 1:6.1, 1:6.2, 1:6.3, 1:6.4, 1:6.5, 1:6.6, 1:6.7, 1:6.8, 1:6.9, 1:7, 1:7.1, 1:7.2, 1:7.3, 1:7.4, 1:7.5, 1:7.6, 1:7.7, 1:7.8, 1:7.9, 1:8, 1:8.1, 1:8.2,1:8.3, 1:8.4, 1:8.5, 1:8.6, 1:8.7, 1:8.8, 1:8.9, 1:9, 1:9.1, 1:9.2, 1:9.3, 1:9.4, 1:9.5, 1:9.6, 1:9.7, 1:9.8, 1:9.9 o 1:10.

[1073] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la proporción del número de TIL en la segunda población de TIL con respecto al número de TIL en la primera población de TIL es de al menos aproximadamente 1,5:1 a al menos aproximadamente 100:1.

[1074] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la proporción del número de TIL en la segunda población de TIL con respecto al número de TIL en la primera población de TIL es igual o aproximadamente 50:1.

[1075] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la proporción del número de TIL en la segunda población de TIL con respecto al número de TIL en la primera población de TIL es igual o aproximadamente 25:1.

[1076] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la proporción del número de TIL en la segunda población de TIL con respecto al número de TIL en la primera población de TIL es igual o aproximadamente 20:1.

[1077] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la proporción del número de TIL en la segunda población de TIL

con respecto al número de TIL en la primera población de TIL es igual o aproximadamente 10:1.

[1078] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la segunda población de TILs es al menos en o aproximadamente 50 veces mayor en número que la primera población de TILs.

[1079] Se divulga en este documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda, modificado de modo que la segunda población de TIL sea al menos igual o aproximadamente 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 21-, 22-, 23-, 24-, 25-, 26-, 27-, 28-, 29-, 30-, 31-, 32-, 33-, 34-, 35-, 36-, 37-, 38-, 39-, 40-, 41-, 42-, 43-, 44-, 45-, 46-, 47-, 48-, 49- o 50- veces mayor en número que la primera población de TIL.

[1080] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en o aproximadamente 2 días o en o aproximadamente 3 días después del comienzo del segundo período en la etapa (c), el medio de cultivo celular se complementa con IL-2 adicional.

[1081] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado para comprender además la etapa de criopreservar la población de TIL recolecciónda en la etapa (d) usando un proceso de criopreservación.

[1082] Se divulga en este documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda, anteriormente modificado para comprender realizar después de la etapa (d) la etapa adicional de (e) transferir la población de TIL recolecciónda de la etapa (d) a una bolsa de infusión que opcionalmente contiene HypoThermosol.

[1083] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado para comprender la etapa de crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolecciónda en la etapa (e) utilizando un proceso de criopreservación.

[1084] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que el proceso de criopreservación se realiza utilizando una proporción 1:1 de la población de TIL recolecciónda con respecto a los medios de criopreservación.

[1085] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables modificados de tal manera que las células presentadoras de antígeno son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

[1086] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que las PBMC son irradiadas y alogénicas.

[1087] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que el número total de APC añadidas al cultivo celular en la etapa (b) sea $2,5 \times 10^8$.

[1088] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que el número total de APC añadidas al cultivo celular en la etapa (b) sea 5×10^8.

[1089] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las APC son PBMC.

[1090] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que las PBMC son irradiadas y alogénicas.

[1091] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado de tal manera que las células presentadoras de antígeno son células presentadoras de antígeno artificiales.

[1092] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado de tal manera que la recolección en la etapa (d) se realiza utilizando un sistema de procesamiento celular basado en membrana.

[1093] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la recolección en la etapa (d) se realiza utilizando un sistema de procesamiento de células LOVO.

[1094] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden entre 5 y 60 fragmentos por envase en

la etapa (b).

[1095] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden entre 10 y 60 fragmentos por envase en la etapa (b).

[1096] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden entre 15 y 60 fragmentos por envase en la etapa (b).

[1097] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden entre 20 y 60 fragmentos por envase en la etapa (b).

[1098] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden entre 25 y 60 fragmentos por envase en la etapa (b).

[1099] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden entre 30 y 60 fragmentos por envase en la etapa (b).

[1100] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden entre 35 y 60 fragmentos por envase en la etapa (b).

[1101] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden entre 40 y 60 fragmentos por envase en la etapa (b).

[1102] el método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprendan entre 45 y 60 fragmentos por envase en la etapa (b).

[1103] Se divulga en el presente documento el método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden entre 50 y 60 fragmentos por envase en la etapa (b).

[1104] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según se aplica anteriormente modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden en o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 fragmento(s) por recipiente en la etapa (b).

[1105] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que cada fragmento tenga un volumen de al menos 27 mm^3.

[1106] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que cada fragmento tiene un volumen de al menos aproximadamente 20 mm^3 a al menos aproximadamente 50 mm^3.

[1107] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que cada fragmento tiene un volumen de al menos aproximadamente 21 mm^3 a al menos aproximadamente 30 mm^3.

[1108] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que cada fragmento tiene un volumen de al menos aproximadamente 22 mm^3 a al menos aproximadamente 29,5 mm^3.

[1109] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que cada fragmento tiene un volumen de al menos aproximadamente 23 mm^3 a al menos aproximadamente 29 mm^3.

[1110] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que cada fragmento tiene un volumen de al menos aproximadamente 24 mm^3 a al menos aproximadamente 28,5 mm^3.

[1111] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según

corresponda, modificado de tal manera que cada fragmento tiene un volumen de al menos aproximadamente 25 mm^3 a al menos aproximadamente 28 mm^3.

[1112] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que cada fragmento tiene un volumen de al menos aproximadamente 26,5 mm^3 a al menos aproximadamente 27,5 mm^3.

[1113] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que cada fragmento tiene un volumen de al menos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 mm^3.

[1114] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden de al menos 30 a al menos 60 fragmentos con un volumen total de al menos 1300 mm^3 a al menos 1500 mm^3.

[1115] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden al menos 50 fragmentos con un volumen total de al menos 1350 mm^3.

[1116] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que los fragmentos múltiples comprenden al menos 50 fragmentos con una masa total de al menos 1 gramo a al menos 1,5 gramos.

[1117] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que el medio de cultivo celular se proporciona en un contenedor que es un contenedor G o una bolsa celular Xuri.

[1118] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado de tal manera que la concentración de IL-2 en el medio de cultivo celular es de aproximadamente 10.000 UI/mL a aproximadamente 5.000 UI/mL.

[1119] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado de tal manera que la concentración de IL-2 en el medio de cultivo celular es de aproximadamente 6.000 UI/mL.

[1120] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado de tal manera que el medio de crioconservación comprende dimetilsulfóxido (DMSO).

[1121] Se divulga aquí un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que el medio de criopreservación comprende de 7% a 10% de DMSO.

[1122] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que el primer período en la etapa (b) se realiza dentro de un período de al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o 7 días.

[1123] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que el segundo período en la etapa (c) se realiza dentro de un período de al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, u 11 días.

[1124] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que el primer período en la etapa (b) y el segundo período en la etapa (c) se realizan cada uno individualmente dentro de un período de al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o 7 días.

[1125] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que el primer período en la etapa (b) y el segundo período en la etapa (c) se realizan cada uno individualmente dentro de un período de al menos 5 días, 6 días, o 7 días.

[1126] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que el primer período en la etapa (b) y el segundo período en la etapa (c) se realizan cada uno individualmente dentro de un período de al menos 7 días.

[1127] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de entre 14 y 18 días.

[1128] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de entre 15 y 18 días.

[1129] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de entre 16 y 18 días.

[1130] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de entre 17 y 18 días.

[1131] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de entre 14 y 17 días.

[1132] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de entre 15 y 17 días.

[1133] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de entre 16 y 17 días.

[1134] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de entre 14 y 16 días.

[1135] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de entre 15 y 16 días.

[1136] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realicen en un total de 14 días o aproximadamente.

[1137] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realicen en un total de 15 días o aproximadamente.

[1138] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realicen en un total de 16 días o aproximadamente.

[1139] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realicen en un total de 17 días o aproximadamente.

[1140] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realicen en un total de 18 días o aproximadamente.

[1141] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realicen en un total de 14 días o menos.

[1142] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realicen en un total de 15 días o menos.

[1143] Se divulga en el presente documento el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realicen en un total de 16 días o menos.

[1144] En el presente documento se divulga un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las etapas (a) a (d) se realicen en un total de 18 días o menos.

[1145]

Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la población terapéutica de TIL recoleccióndа en la etapa (d) comprende suficientes TIL para una dosis terapéuticamente eficaz de los TIL.

[1146] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que el número de TIL suficiente para una dosis terapéuticamente eficaz es de al menos aproximadamente $2,3\times10^{10}$ a al menos aproximadamente $13,7\times10^{10}$.

[1147] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la tercera población de TIL en la etapa (c) proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón-gamma y/o una mayor policlonalidad.

[1148] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la tercera población de TIL en la etapa (c) proporciona al menos una producción de interferón-gamma de una a cinco veces o más en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 16 días.

[1149] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la tercera población de TIL en la etapa (c) proporciona al menos una producción de interferón-gamma de una a cinco veces o más en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 17 días.

[1150] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la tercera población de TIL en la etapa (c) proporciona al menos una producción de interferón-gamma de una a cinco veces o más en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 18 días.

[1151] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que las células T efectoras y/o células T de memoria central obtenidas de la tercera población de TILs etapa (c) exhiben una mayor expresión de CD8 y CD28 en relación con las células T efectoras y/o células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células etapa (b).

[1152] Se divulga aquí un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según lo aplicable arriba modificado tal que cada envase recitado en el método es un envase cerrado.

[1153] Se divulga aquí un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según lo aplicable arriba modificado tal que cada envase recitado en el método es un G-contenedor.

[1154] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que cada contenedor recitado en el método es un GREX-10.

[1155] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que cada contenedor recitado en el método es un GREX-100.

[1156] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que cada contenedor recitado en el método es un GREX-500.

[1157] En el presente documento se divulga una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) fabricada por el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda.

[1158] En el presente documento se describe una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en la que la población terapéutica de TIL proporciona mayor eficacia, mayor producción de interferón-gamma y/o mayor policlonalidad en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin células presentadoras de antígenos (APC) u OKT3 añadidas.

[1159] En el presente documento se describe una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en la que la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma, y/o una mayor policlonalidad en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin células presentadoras de antígenos (APC) añadidas.

[1160] En el presente documento se describe una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en la que la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón-gamma, y/o una mayor policlonalidad en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin OKT3 añadido.

[1161] En el presente documento se describe una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en la que la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma, y/o una mayor policlonalidad en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin células presentadoras de antígenos (APC) añadidas y sin OKT3 añadido.

[1162] En el presente documento se divulga una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en la que la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón-gamma y/o una mayor policlonalidad en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 16 días.

[1163] En el presente documento se divulga una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en la que la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón-gamma y/o una mayor policlonalidad en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 17 días.

[1164] En el presente documento se divulga una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) preparada

a partir de tejido tumoral de un paciente, en la que la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón-gamma y/o una mayor policlonalidad en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 18 días.

[1165] Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, que proporciona un aumento de la producción de interferón-gamma.

[1166] Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente que proporciona una policlonalidad aumentada.

[1167] Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, que proporciona una mayor eficacia.

[1168] Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificada de tal manera que la población terapéutica de TILs es capaz de al menos una vez más producción de interferón-gamma en comparación con TILs preparados mediante un proceso de más de 16 días. Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificada de tal manera que la población terapéutica de TILs es capaz de al menos una vez más producción de interferón-gamma en comparación con TILs preparados mediante un proceso de más de 17 días. Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificada de tal manera que la población terapéutica de TILs es capaz de al menos una vez más producción de interferón-gamma en comparación con TILs preparados mediante un proceso de más de 18 días. En algunas divulgaciones del presente documento, los TIL son capaces de producir al menos una vez más interferón-gamma debido al proceso de expansión descrito en el presente documento, por ejemplo como se describe en las Etapas A a F anteriores o según las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C).

[1169] Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificada de tal manera que la población terapéutica de TILs es capaz de al menos dos veces más producción de interferón-gamma en comparación con TILs preparadas mediante un proceso de más de 16 días. Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificada de tal manera que la población terapéutica de TILs es capaz de al menos dos veces más producción de interferón-gamma en comparación con TILs preparados mediante un proceso de más de 17 días. Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificada de tal manera que la población terapéutica de TILs es capaz de al menos dos veces más producción de interferón-gamma en comparación con TILs preparados mediante un proceso de más de 18 días. En algunas divulgaciones del presente documento, los TIL se vuelven capaces de producir al menos dos veces más interferón-gamma debido al proceso de expansión descrito en el presente documento, por ejemplo como se describe en las Etapas A a F anteriores o según las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C).

[1170] Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificada de tal manera que la población terapéutica de TILs es capaz de al menos tres veces más producción de interferón-gamma en comparación con TILs preparados mediante un proceso de más de 16 días. Se divulga en el presente documento la población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificada de tal manera que la población terapéutica de TILs es capaz de al menos tres veces más producción de interferón-gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 17 días. Se divulga en el presente documento una población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificada de tal manera que la población terapéutica de TILs es capaz de al menos tres veces más producción de interferón-gamma en comparación con TIL preparados mediante un proceso de más de 18 días. En algunas divulgaciones del presente documento, los TIL se vuelven capaces de producir al menos tres veces más interferón-gamma debido al proceso de expansión descrito en el presente documento, por ejemplo como se describe en las Etapas A a F anteriores o según las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C).

[1171] En el presente documento se describe una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) capaz de producir al menos una vez más interferón gamma que los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin añadir células presentadoras de antígenos (APC). En algunas divulgaciones del presente documento, los TIL son capaces de producir al menos una vez más interferón-gamma debido al proceso de expansión descrito en el presente documento, por ejemplo como se describe en las Etapas A a F anteriores o según las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C).

[1172] En el presente documento se describe una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que es capaz de producir al menos una vez más interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin OKT3 añadido. En algunas divulgaciones del presente documento,

los TIL son capaces de producir al menos una vez más interferón-gamma debido al proceso de expansión descrito en el presente documento, por ejemplo como se describe en las Etapas A a F anteriores o según las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C).

[1173] En el presente documento se describe una población terapéutica de TIL que es capaz de producir al menos dos veces más interferón gamma que los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin ninguna APC añadida. En algunas divulgaciones del presente documento, los TIL se vuelven capaces de producir al menos dos veces más interferón-gamma debido al proceso de expansión descrito en el presente documento, por ejemplo como se describe en las Etapas A a F anteriores o según las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C).

[1174] En el presente documento se describe una población terapéutica de TIL que es capaz de producir al menos dos veces más interferón gamma que los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin OKT3 añadido. En algunas divulgaciones del presente documento, los TIL se vuelven capaces de producir al menos dos veces más interferón-gamma debido al proceso de expansión descrito en el presente documento, por ejemplo como se describe en las Etapas A a F anteriores o según las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C).

[1175] En el presente documento se describe una población terapéutica de TIL capaz de producir al menos tres veces más interferón gamma que los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin APC añadidas. En algunas divulgaciones del presente documento, los TIL son capaces de producir al menos una vez más interferón-gamma debido al proceso de expansión descrito en el presente documento, por ejemplo como se describe en las Etapas A a F anteriores o según las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C).

[1176] En el presente documento se describe una población terapéutica de células TIL capaz de producir al menos tres veces más interferón gamma que las células TIL preparadas mediante un proceso en el que la primera expansión de células TIL se realiza sin añadir OKT3. En algunas divulgaciones del presente documento, los TIL se vuelven capaces de producir al menos tres veces más interferón-gamma debido al proceso de expansión descrito en el presente documento, por ejemplo como se describe en las Etapas A a F anteriores o según las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8 (en particular, *por ejemplo*, la Figura 8B y/o la Figura 8C).

[1177] En el presente documento se describe un método de expansión de células T que comprende: (a) realizar una primera expansión de cebado de una primera población de células T obtenida de un donante cultivando la primera población de células T para efectuar el crecimiento y cebar una activación de la primera población de células T; (b) después de que la activación de la primera población de células T cebada en la etapa (a) comienza a decaer, realizar una segunda expansión rápida de la primera población de células T cultivando la primera población de células T para efectuar el crecimiento y cebar la activación de la primera población de células T para obtener una segunda población de células T; y (c) recolecciónr la segunda población de células T. La etapa de segunda expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr una ampliación del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y luego (b) efectuar la transferencia de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala a un segundo recipiente más grande que el primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 500MCS, y cultivar la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en un cultivo a mayor escala en el segundo recipiente durante un período de aproximadamente 4 a 7 días. La etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr un escalado del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera población de células T en un primer cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, por ejemplo, un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, y a continuación (b) efectuando la transferencia y reparto de la primera población de células T desde el primer cultivo a pequeña escala a y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos recipientes de igual tamaño que el primer recipiente, en los que en cada segundo recipiente la porción de la primera población de células T del primer cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala durante un periodo de aproximadamente 4 a 7 días. La etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr un escalado y un aumento de escala del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, por ejemplo, un contenedor G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y a continuación (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T desde el cultivo a pequeña escala a y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos contenedores de mayor tamaño que el primer contenedor, por ejemplo, contenedores G-REX 500MCS, en los que en cada segundo contenedor la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo contenedor se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 4 a 7 días. La etapa de expansión rápida puede dividirse en una pluralidad de etapas para lograr un escalado y un aumento de escala del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, por ejemplo, un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y reparto de la primera población de células T desde el cultivo a pequeña escala a y entre 2, 3 o 4 segundos contenedores que son mayores en tamaño que el primer contenedor, por ejemplo, contenedores G-REX 500MCS, en los

que en cada segundo contenedor la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo contenedor se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de unos 5 días.

[1178] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la etapa de la segunda expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, *por ejemplo*, un recipiente G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 2 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia de la primera población de células T desde el cultivo a pequeña escala a un segundo recipiente mayor que el primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 500MCS, y cultivar la primera población de células T desde el cultivo a pequeña escala en un cultivo a mayor escala en el segundo recipiente durante un periodo de aproximadamente 5 a 7 días.

[1179] Se describe en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda, modificado de modo que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalamiento del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera población de células T en un primer cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 2 a 4 días, y luego (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del primer cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos recipientes que son iguales en tamaño al primer recipiente, en donde en cada segundo recipiente la porción de la primera población de células T del primer cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala durante un período de aproximadamente 5 a 7 días.

[1180] Se describe en este documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda, modificado de tal manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un aumento y una reducción de escala del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 2 a 4 días, y luego (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos recipientes que son más grandes que el primer recipiente, por ejemplo, G-REX Contenedores de 500MCS, en donde en cada segundo contenedor la porción de la primera población de células T del cultivo de pequeña escala transferida a dicho segundo contenedor se cultiva en un cultivo de mayor escala durante un período de aproximadamente 5 a 7 días.

[1181] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado y un aumento de escala del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, *por ejemplo,* un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, y a continuación (b) efectuar la transferencia y reparto de la primera población de células T desde el cultivo a pequeña escala a y entre 2, 3 o 4 segundos contenedores que son mayores en tamaño que el primer contenedor, *por ejemplo*, contenedores G-REX 500MCS, en los que en cada segundo contenedor la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo contenedor se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de aproximadamente 5 a 6 días.

[1182] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado y un aumento de escala del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, *por ejemplo,* un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, y a continuación (b) efectuar la transferencia y reparto de la primera población de células T desde el cultivo a pequeña escala a y entre 2, 3 o 4 segundos contenedores que son mayores en tamaño que el primer contenedor, *por ejemplo*, contenedores G-REX 500MCS, en los que en cada segundo contenedor la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo contenedor se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de aproximadamente 5 días.

[1183] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado y un aumento de escala del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, por ejemplo, un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, y a continuación (b) efectuar la transferencia y reparto de la primera población de células T desde el cultivo a pequeña escala a y entre 2, 3 o 4 segundos contenedores que son mayores en tamaño que el primer contenedor, por ejemplo, contenedores G-REX 500MCS, en los que en cada segundo contenedor la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo contenedor se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de aproximadamente 6 días.

[1184] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado y un aumento de escala del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida cultivando la primera

población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer contenedor, *por ejemplo,* un contenedor G-REX 100MCS, durante un periodo de aproximadamente 3 a 4 días, y a continuación (b) efectuar la transferencia y reparto de la primera población de células T desde el cultivo a pequeña escala a y entre 2, 3 o 4 segundos contenedores que son mayores en tamaño que el primer contenedor, *por ejemplo*, contenedores G-REX 500MCS, en los que en cada segundo contenedor la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo contenedor se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un periodo de aproximadamente 7 días.

[1185] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la primera expansión de cebado de la etapa (a) se realiza durante un período de hasta 7 días.

[1186] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 8 días.

[1187] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 9 días.

[1188] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 10 días.

[1189] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 11 días.

[1190] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la primera expansión de cebado de la etapa (a) se realiza durante un período de 7 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 9 días.

[1191] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la primera expansión de cebado de la etapa (a) se realiza durante un período de 7 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 10 días.

[1192] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la primera expansión de cebado de la etapa (a) se realiza durante un período de 7 días u 8 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 9 días.

[1193] En el presente documento se describe un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores, según corresponda, modificado de tal manera que la primera expansión de cebado en la etapa (a) se realiza durante un período de 7 días u 8 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 10 días.

[1194] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la primera expansión de cebado de la etapa (a) se realiza durante un período de 8 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 9 días.

[1195] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que la primera expansión de cebado de la etapa (a) se realiza durante un período de 8 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 8 días.

[1196] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables modificados anteriormente de tal manera que en la etapa (a) la primera población de células T se cultiva en un primer medio de cultivo que comprende OKT-3 e IL-2.

[1197] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que el primer medio de cultivo comprende agonista 4-1BB, OKT-3 e IL-2.

[1198] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que el primer medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y células presentadoras de antígeno (APC).

[1199] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que el primer medio de cultivo comprende agonista 4-1BB, OKT-3, IL-2 y células presentadoras de antígeno (APC).

[1200] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) la primera población de células T se cultiva en un segundo medio de cultivo que comprende OKT-3, IL-2 y células presentadoras de antígeno (APC).

[1201] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que el segundo medio de cultivo comprende agonista 4-1BB, OKT-3, IL-2 y células presentadoras de antígeno (APC).

[1202] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según sea aplicable, modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de células T se cultiva en un primer medio de cultivo en un recipiente que comprende una primera superficie permeable al gas, donde el primer medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y una primera población de células presentadoras de antígeno (APC), en el que la primera población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la primera población de APC se coloca en capas sobre la primera superficie permeable al gas, donde en la etapa (b) la primera población de células T se cultiva en un segundo medio de cultivo en el contenedor, donde el segundo medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y una segunda población de APCs, donde la segunda población de APCs es exógena al donante de la primera población de células T y la segunda población de APCs se estratifica sobre la primera superficie permeable al gas, y donde la segunda población de APCs es mayor que la primera población de APCs.

[1203] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de células T se cultiva en un primer medio de cultivo en un recipiente que comprende una primera superficie permeable al gas en el que el primer medio de cultivo comprende un agonista 4-1BB, OKT-3, IL-2 y una primera población de células presentadoras de antígeno (APC), donde la primera población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la primera población de APC se coloca en capas sobre la primera superficie permeable al gas, donde en la etapa (b) la primera población de células T se cultiva en un segundo medio de cultivo en el contenedor, donde el segundo medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y una segunda población de APCs, donde la segunda población de APCs es exógena al donante de la primera población de células T y la segunda población de APCs se estratifica sobre la primera superficie permeable al gas, y donde la segunda población de APCs es mayor que la primera población de APCs.

[1204] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según sea aplicable, modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de células T se cultiva en un primer medio de cultivo en un recipiente que comprende una primera superficie permeable al gas, en el que el primer medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y una primera población de células presentadoras de antígeno (APC), en el que la primera población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la primera población de APC se coloca en capas sobre la primera superficie permeable al gas, donde en la etapa (b) la primera población de células T se cultiva en un segundo medio de cultivo en el contenedor, donde el segundo medio de cultivo comprende agonista 4-1BB, OKT-3, IL-2 y una segunda población de APCs, donde la segunda población de APCs es exógena al donante de la primera población de células T y la segunda población de APCs se coloca en capas sobre la primera superficie permeable al gas, y donde la segunda población de APCs es mayor que la primera población de APCs.

[1205] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de células T se cultiva en un primer medio de cultivo en un recipiente que comprende una primera superficie permeable a los gases en el que el primer medio de cultivo comprende un agonista 4-1BB, OKT-3, IL-2 y una primera población de células presentadoras de antígeno (APC), en el que la primera población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la primera población de APC se coloca en capas sobre la primera superficie permeable al gas, donde en la etapa (b) la primera población de células T se cultiva en un segundo medio de cultivo en el contenedor, donde el segundo medio de cultivo comprende agonista 4-1BB, OKT-3, IL-2 y una segunda población de APCs, donde la segunda población de APCs es exógena al donante de la primera población de células T y la segunda población de APCs se coloca en capas sobre la primera superficie permeable al gas, y donde la segunda población de APCs es mayor que la primera población de APCs.

[1206] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la proporción del número de APC en la segunda población de APC con respecto al número de APC en la primera población de APC es de aproximadamente 2:1.

[1207] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que el número de APCs en la primera población de APCs es de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ y el número de APCs en la segunda población de APCs es de aproximadamente 5×10^8.

[1208] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de APCs se estratifica sobre la primera superficie permeable al gas a un grosor medio de 2 capas de APCs.

[1209] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) la segunda población de APCs se estratifica sobre

la primera superficie permeable al gas a un espesor medio seleccionado del intervalo de 4 a 8 capas de APCs.

[1210] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la relación entre el número medio de capas de APC dispuestas sobre la primera superficie permeable al gas en la etapa (b) y el número medio de capas de APC dispuestas sobre la primera superficie permeable al gas en la etapa (a) es de 2:1.

[1211] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada del intervalo de en o aproximadamente $1,0\times10^6$ APCs/cm^2 a en o aproximadamente $4,5\times10^6$ APCs/cm^2.

[1212] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada del intervalo de en o aproximadamente $1,5\times10^6$ APCs/cm^2 a en o aproximadamente $3,5\times10^6$ APCs/cm^2.

[1213] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada del intervalo de en o aproximadamente $2,0\times10^6$ APCs/cm^2 a en o aproximadamente $3,0\times10^6$ APCs/cm^2.

[1214] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad de al menos aproximadamente $2,0\times10^6$ APCs/cm^2.

[1215] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) la segunda población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada del intervalo de al menos aproximadamente $2,5\times10^6$ APCs/cm^2 a al menos aproximadamente $7,5\times10^6$ APCs/cm^2.

[1216] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) la segunda población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada del intervalo de al menos aproximadamente $3,5\times10^6$ APCs/cm^2 a al menos aproximadamente $6,0\times10^6$ APCs/cm^2.

[1217] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) la segunda población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada del intervalo de al menos aproximadamente $4,0\times10^6$ APCs/cm^2 a al menos aproximadamente $5,5\times10^6$ APCs/cm^2.

[1218] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (b) la segunda población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad de al menos aproximadamente $4,0\times10^6$ APCs/cm^2.

[1219] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada del intervalo de en o aproximadamente $1,0\times10^6$ APCs/cm^2 a $4,5\times10^6$ APCs/cm^2 y en la etapa (b) la segunda población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada entre $2,5\times10^6$ APCs/cm^2 a $7,5\times10^6$ APCs/cm^2 aproximadamente.

[1220] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores, modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de APCs se siembra en la primera superficie permeable a gas a una densidad seleccionada del intervalo de al menos aproximadamente $1,5\times10^6$ APCs/cm^2 a aproximadamente $3,5\times10^6$ APCs/cm^2 y en la etapa (b) la segunda población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada del intervalo de aproximadamente $3,5\times10^6$ APCs/cm^2 a aproximadamente $6,0\times10^6$ APCs/cm^2.

[1221] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada del intervalo de en o aproximadamente $2,0\times10^6$ APCs/cm^2 a $3,0\times10^6$ APCs/cm^2 y en la etapa (b) la segunda población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad seleccionada entre $4,0\times10^6$ APCs/cm^2 a $5,5\times10^6$ APCs/cm^2 aproximadamente.

[1222] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en la etapa (a) la primera población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad de al menos aproximadamente $2,0\times10^6$ APCs/cm^2 y en la etapa (b)

la segunda población de APCs se siembra en la primera superficie permeable al gas a una densidad de al menos aproximadamente $4,0\times10^6$ APCs/cm^2.

[1223] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado de tal manera que las APC son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

[1224] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las PBMC se irradian y son exógenas al donante de la primera población de células T.

[1225] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las células T son linfocitos infiltrantes de tumores (TIL).

[1226] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que las células T son linfocitos infiltrantes de médula ósea (MIL).

[1227] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado de tal manera que las células T son linfocitos de sangre periférica (PBL).

[1228] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado de tal manera que la primera población de células T se obtiene por separación de la sangre total del donante.

[1229] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes aplicables anteriormente modificado de tal manera que la primera población de células T se obtiene por separación del producto de aféresis del donante.

[1230] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la primera población de células T se separa de la sangre total o del producto de aféresis del donante mediante selección positiva o negativa de un fenotipo de células T.

[1231] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que el fenotipo de células T sea CD3+ y CD45+.

[1232] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según corresponda, modificado de tal manera que antes de realizar la primera expansión de cebado de la primera población de células T, las células T se separan de las células NK. Las células T pueden separarse de las células NK en la primera población de células T mediante la eliminación de las células CD3- CD56+ de la primera población de células T. Las células CD3- CD56+ pueden eliminarse de la primera población de células T sometiendo la primera población de células T a clasificación celular utilizando una estrategia de separación que elimine la fracción de células CD3- CD56+ y recupere la fracción negativa. El método anterior puede utilizarse para la expansión de células T en una primera población de células T caracterizada por un alto porcentaje de células NK. El método anterior puede utilizarse para la expansión de células T en una primera población de células T caracterizada por un alto porcentaje de células CD3- CD56+. El método anterior puede utilizarse para la expansión de células T en tejido tumoral caracterizado por la presencia de un elevado número de células NK. El método anterior puede utilizarse para la expansión de células T en tejido tumoral caracterizado por un elevado número de células CD3- CD56+. El método anterior puede utilizarse para la expansión de células T en tejido tumoral obtenido de un paciente que padece un tumor caracterizado por la presencia de un elevado número de células NK. El método anterior puede utilizarse para la expansión de células T en tejido tumoral obtenido de un paciente que padece un tumor caracterizado por la presencia de un elevado número de células CD3- CD56+. El método anterior puede utilizarse para la expansión de células T en tejido tumoral obtenido de una paciente que padece cáncer de ovario.

[1233] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que en o aproximadamente 1×10^7 células T de la primera población de células T se siembran en un contenedor para iniciar el cultivo primario de primera expansión en dicho contenedor.

[1234] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes según sea aplicable anteriormente modificado de tal manera que la primera población de células T se distribuye en una pluralidad de contenedores, y en cada contenedor se siembran en o aproximadamente 1×10^7 células T de la primera población de células T para iniciar el cultivo primario de primera expansión en dicho contenedor.

[1235] Se divulga en el presente documento un método descrito en cualquiera de los párrafos precedentes, según corresponda, modificado de tal manera que la segunda población de células T recolecciónda en la etapa (c) es una población terapéutica de TIL.

V. Composiciones farmacéuticas, dosis, y regímenes de dosificación

[1236] En una realización, los TIL expandidos utilizando los métodos de la presente divulgación se administran a un paciente como una composición farmacéutica. En una realización, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un tampón estéril. Los TIL expandidos utilizando PBMC de la presente divulgación pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, las células T se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferiblemente dura aproximadamente de 30 a 60 minutos. Otras vías de administración adecuadas incluyen la administración intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[1237] Puede administrarse cualquier dosis adecuada de TIL. En algunas realizaciones, se administran de aproximadamente $2,3\times101^{0}$ a aproximadamente $13,7\times10^{10}$ TILs, con una media de aproximadamente $7,8\times10^{10}$ TILs, particularmente si el cáncer es melanoma. En una realización, se administran entre $1,2\times10^{10}$ y $4,3\times10^{10}$ de TIL. En algunas realizaciones, se administran entre 3×10^{10} y 12×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, se administran entre 4×10^{10} y 10×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, se administran entre 5×10^{10} y 8×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, se administran entre 6×10^{10} y 8×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, se administran entre 7×10^{10} y 8×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente $2,3\times10^{10}$ a aproximadamente $13,7\times10^{10}$. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente $7,8\times10^{10}$ TILs, particularmente si el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente $1,2\times10^{10}$ a aproximadamente $4,3\times10^{10}$ TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 3×10^{10} a aproximadamente 12×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 4×10^{10} a aproximadamente 10×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 5×10^{10} a aproximadamente 8×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 6×10^{10} a aproximadamente 8×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 7×10^{10} a aproximadamente 8×10^{10} TILs.

[1238] En algunas realizaciones, el número de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es de aproximadamente 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}, $4x10^{9}$, 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}, y 9×10^{13}. En una realización, el número de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de 1×10^{6} to 5×10^{6}, 5×10^{6} to 1×10^{7}, 1×10^{7} to 5×10^{7}, 5×10^{7} to 1×10^{8}, 1×10^{8} to 5×10^{8}, 5×10^{8} to 1×10^{9}, 1×10^{9} to 5×10^{9}, 5×10^{9} to 1×10^{10}, 1×10^{10} to 5×10^{10}, 5×10^{10} to 1×10^{11}, 5×10^{11} to 1×10^{12}, 1×10^{12} to 5×10^{12}, y 5×10^{12} a 1×10^{13}.

[1239] **En** algunas realizaciones, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es inferior a, por ejemplo, 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% o 0.0001% p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

[1240] **En** algunas realizaciones, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es superior al 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%, 1.75%, 1.50%, 7.25% 7%, 6.75%, 6.50%, 6.25% 6%, 5.75%, 5.50%, 5.25% 5%, 4.75%, 4.50%, 4.25%, 4%, 3.75%, 3.50%, 3.25%, 3%, 2.75%, 2.50%, 2.25%, 2%, 1.75%, 1.50%, 125%, 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% o 0.0001% p/p, p/v, o v/v de la composición farmacéutica.

[1241] En algunas realizaciones, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el rango de aproximadamente 0.0001% a aproximadamente 50%, aproximadamente 0,001% a aproximadamente 40%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 30%, aproximadamente 0,02% a aproximadamente 29%, aproximadamente 0,03% a aproximadamente 28%, aproximadamente 0,04% a aproximadamente 27%, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 26%, aproximadamente 0,06% a aproximadamente 25%, aproximadamente 0,07% a aproximadamente 24%, aproximadamente 0,08% a aproximadamente 23%, aproximadamente 0,09% a aproximadamente 22%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 21%, aproximadamente 0,2% a aproximadamente 20%, aproximadamente 0,3% a aproximadamente 19%, aproximadamente 0,4% a aproximadamente 18%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 17%, aproximadamente 0,6% a aproximadamente 16%, aproximadamente 0,7% a aproximadamente 15%, aproximadamente 0,8% a aproximadamente 14%, aproximadamente 0,9% a aproximadamente 12% o aproximadamente 1% a aproximadamente 10% p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

[1242] En algunas realizaciones, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%, aproximadamente 0,02% a aproximadamente 4,5%, aproximadamente 0,03% a aproximadamente 4%, aproximadamente 0,04% a aproximadamente 3,5%, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 3%,

aproximadamente 0,06% a aproximadamente 2,5%, aproximadamente 0,07% a aproximadamente 2%, aproximadamente 0,08% a aproximadamente 1,5%, aproximadamente 0,09% a aproximadamente 1%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,9% p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

[1243] **En** algunas realizaciones, la cantidad de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es igual o inferior a 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, o 0,0001 g.

[1244] En algunas realizaciones, la cantidad de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es superior a 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, o 10 g.

[1245] Los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención son eficaces en un amplio intervalo de dosis. La dosis exacta dependerá de la vía de administración, la forma en que se administre el compuesto, el sexo y la edad del sujeto a tratar, el peso corporal del sujeto a tratar y la preferencia y experiencia del médico que lo atienda. También pueden utilizarse, si procede, las dosis clínicamente establecidas de los TIL. Las cantidades de las composiciones farmacéuticas administradas mediante los métodos aquí descritos, como las dosis de TIL, dependerán del ser humano o mamífero tratado, la gravedad del trastorno o afección, la velocidad de administración, la disposición de los principios activos farmacéuticos y la discreción del médico prescriptor.

[1246] **En** algunas realizaciones, los TIL pueden administrarse en una dosis única. Dicha administración puede realizarse mediante inyección, por ejemplo, intravenosa. En algunas realizaciones, los TIL pueden administrarse en dosis múltiples. La dosificación puede ser una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de seis veces al año. La dosificación puede ser una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana o una vez cada dos días. La administración de los TIL puede continuar mientras sea necesario.

[1247] En algunas realizaciones, una dosis eficaz de TIL es de aproximadamente 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, $4x10^9$, 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}, y 9×10^{13}. En algunas realizaciones, una dosis eficaz de TIL está en el intervalo de 1×10^6 a 5×10^6, 5×10^6 a 1×10^7, 1×10^7 a 5×10^7, 5×10^7 a 1×10^8, 1×10^8 to 5×10^8, 5×10^8 a 1×10^9, 1×10^9 a 5×10^9, 5×10^9 a 1×10^{10}, 1×10^{10} a 5×10^{10}, 5×10^{10} a 1×10^{11}, 5×10^{11} a 1×10^{12}, 1×10^{12} a 5×10^{12}, y 5×10^{12} a 1×10^{13}.

[1248] En algunas realizaciones, una dosis efectiva de TIL está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 4,3 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3,2 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 1,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,55 mg/kg a aproximadamente 0,85 mg/kg, aproximadamente 0,65 mg/kg a aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 0,75 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,85 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1,85 mg/kg, aproximadamente 1,15 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg a aproximadamente 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,35 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 2,3 mg/kg a aproximadamente 3,4 mg/kg, aproximadamente 2,4 mg/kg a aproximadamente 3,3 mg/kg, aproximadamente 2,6 mg/kg a aproximadamente 3,15 mg/kg, aproximadamente 2,7 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 2,8 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, o aproximadamente 2,85 mg/kg a aproximadamente 2,95 mg/kg.

[1249] En algunas realizaciones, una dosis eficaz de TIL está en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 5 mg a aproximadamente 45 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 40 mg, aproximadamente 15 mg a aproximadamente 35 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 30 mg, aproximadamente 23 mg a aproximadamente 28 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 60 mg a aproximadamente 140 mg, aproximadamente 70 mg a aproximadamente 130 mg, aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, aproximadamente 90 mg a

aproximadamente 110 mg, o aproximadamente 95 mg a aproximadamente 105 mg, aproximadamente 98 mg a aproximadamente 102 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 160 mg a aproximadamente 240 mg, aproximadamente 170 mg a aproximadamente 230 mg, de aproximadamente 180 mg a aproximadamente 220 mg, de aproximadamente 190 mg a aproximadamente 210 mg, de aproximadamente 195 mg a aproximadamente 205 mg, o de aproximadamente 198 a aproximadamente 207 mg.

[1250] Una cantidad eficaz de los TIL puede administrarse en dosis únicas o múltiples por cualquiera de los modos aceptados de administración de agentes que tienen utilidades similares, incluidas las vías intranasal y transdérmica, por inyección intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, tópica, por trasplante, o por inhalación.

[1251] En otra realización, la invención proporciona una bolsa de infusión que comprende la población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos anteriores.

[1252] En otra realización, la invención proporciona una composición de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que comprende la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

[1253] En otra realización, la invención proporciona una bolsa de infusión que comprende la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores.

[1254] En otra realización, la invención proporciona una preparación criopreservada de la población terapéutica de TILs descrita en cualquiera de los párrafos anteriores.

[1255] En otra realización, la invención proporciona una composición de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que comprende la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores y un medio de criopreservación.

[1256] En otra realización, la invención proporciona la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores modificada de tal manera que el medio de criopreservación contiene DMSO.

[1257] En otra realización, la invención proporciona la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores modificada de tal manera que el medio de criopreservación contiene 7-10% de DMSO.

[1258] En otra realización, la invención proporciona una preparación criopreservada de la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores.

VI. Composiciones farmacéuticas, dosis, y regímenes de dosificación

[1259] En una realización, los TIL expandidos utilizando los métodos de la presente divulgación se administran a un paciente como una composición farmacéutica. En una realización, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un tampón estéril. Los TIL expandidos utilizando PBMC de la presente divulgación pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, las células T se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferiblemente dura aproximadamente de 30 a 60 minutos. Otras vías de administración adecuadas incluyen la administración intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[1260] Puede administrarse cualquier dosis adecuada de TIL. En algunas realizaciones, se administran de aproximadamente $2{,}3\times10^{10}$ a aproximadamente $13{,}7\times10^{10}$ TIL, con una media de aproximadamente $7{,}8\times10^{10}$ TIL, en particular si el cáncer es NSCLC. En una realización, se administran entre $1{,}2\times10^{10}$ y $4{,}3\times10^{10}$ de TIL. En algunas realizaciones, se administran entre 3×10^{10} y 12×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, se administran entre 4×10^{10} y 10×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, se administran entre 5×10^{10} y 8×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, se administran entre 6×10^{10} y 8×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, se administran entre 7×10^{10} y 8×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente $2{,}3\times10^{10}$ a aproximadamente $13{,}7\times10^{10}$. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente $7{,}8\times10^{10}$ TIL, en particular si el cáncer es NSCLC. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente $1{,}2\times10^{10}$ a aproximadamente $4{,}3\times10^{10}$ de TIL. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 3×10^{10} a aproximadamente 12×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 4×10^{10} a aproximadamente 10×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 5×10^{10} a aproximadamente 8×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 6×10^{10} a aproximadamente 8×10^{10} TILs. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 7×10^{10} a aproximadamente 8×10^{10} TILs.

[1261] En algunas realizaciones, el número de TIL proporcionado en las composiciones farmacéuticas de la invención es de aproximadamente 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}, $4x10^{9}$, 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}, y 9×10^{13}. En una realización, el número de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de 1×10^{6} a 5×10^{6}, 5×10^{6} a 1×10^{7}, 1×10^{7} a 5×10^{7}, 5×10^{7} a 1×10^{8}, 1×10^{8} a 5×10^{8}, 5×10^{8} a 1×10^{9}, 1×10^{9} a 5×10^{9}, 5×10^{9} a 1×10^{10}, 1×10^{10} a 5×10^{10}, 5×10^{10} a 1×10^{11}, 5×10^{11} a 1×10^{12} 1×10^{12} a 5×10^{12}, y 5×10^{12} a 1×10^{13}.

[1262] **En** algunas realizaciones, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es inferior a, por ejemplo, 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% o 0.0001% p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

[1263] **En** algunas realizaciones, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es superior al 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19.75%, 19.50%, 19.25% 19%, 18.75%, 18.50%, 18.25% 18%, 17.75%, 17.50%, 17.25% 17%, 16.75%, 16.50%, 16.25% 16%, 15.75%, 15.50%, 15.25% 15%, 14.75%, 14.50%, 14.25% 14%, 13.75%, 13.50%, 13.25% 13%, 12.75%, 12.50%, 12.25% 12%, 11.75%, 11.50%, 11.25% 11%, 10.75%, 10.50%, 10.25% 10%, 9.75%, 9.50%, 9.25% 9%, 8.75%, 8.50%, 8.25% 8%, 7.75%, 7.50%, 7.25% 7%, 6.75%, 6.50%, 6.25% 6%, 5.75%, 5.50%, 5.25% 5%, 4.75%, 4.50%, 4.25%, 4%, 3.75%, 3.50%, 3.25%, 3%, 2.75%, 2.50%, 2.25%, 2%, 1.75%, 1.50%, 125%, 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% o 0.0001% p/p, p/v, o v/v de la composición farmacéutica.

[1264] En algunas realizaciones, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 50%, aproximadamente 0,001% a aproximadamente 40%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 30%, aproximadamente 0,02% a aproximadamente 29%, aproximadamente 0,03% a aproximadamente 28%, aproximadamente 0,04% a aproximadamente 27%, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 26%, aproximadamente 0,06% a aproximadamente 25%, aproximadamente 0,07% a aproximadamente 24%, aproximadamente 0,08% a aproximadamente 23%, aproximadamente 0,09% a aproximadamente 22%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 21%, aproximadamente 0,2% a aproximadamente 20%, aproximadamente 0,3% a aproximadamente 19%, aproximadamente 0,4% a aproximadamente 18%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 17%, aproximadamente 0,6% a aproximadamente 16%, aproximadamente 0,7% a aproximadamente 15%, aproximadamente 0,8% a aproximadamente 14%, aproximadamente 0,9% a aproximadamente 12%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 10% p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

[1265] En algunas realizaciones, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%, aproximadamente 0,02% a aproximadamente 4,5%, aproximadamente 0,03% a aproximadamente 4%, aproximadamente 0,04% a aproximadamente 3,5%, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 3%, aproximadamente 0,06% a aproximadamente 2,5%, aproximadamente 0,07% a aproximadamente 2%, aproximadamente 0,08% a aproximadamente 1,5%, aproximadamente 0,09% a aproximadamente 1%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,9% p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

[1266] **En** algunas realizaciones, la cantidad de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es igual o inferior a 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, o 0,0001 g.

[1267] En algunas realizaciones, la cantidad de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es superior a 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, o 10 g.

[1268] **Los** TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención son eficaces en un amplio intervalo de dosis. La dosis exacta dependerá de la vía de administración, la forma en que se administre el compuesto, el sexo y la edad del sujeto a tratar, el peso corporal del sujeto a tratar y la preferencia y experiencia del médico que lo atienda. También pueden utilizarse, si procede, las dosis clínicamente establecidas de los TIL. Las cantidades de las composiciones farmacéuticas administradas mediante los métodos aquí descritos, como las dosis de TIL, dependerán del ser humano o mamífero tratado, la gravedad del trastorno o afección, la velocidad de administración, la disposición de los principios activos farmacéuticos y la discreción del médico prescriptor.

[1269] **En** algunas realizaciones, los TIL pueden administrarse en una dosis única. Dicha administración puede realizarse

mediante inyección, por ejemplo, intravenosa. En algunas realizaciones, los TIL pueden administrarse en dosis múltiples. La dosificación puede ser una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de seis veces al año. La dosificación puede ser una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana o una vez cada dos días. La administración de los TIL puede continuar mientras sea necesario.

[1270] En algunas realizaciones, una dosis eficaz de TIL es de aproximadamente 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, $4x10^9$, 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}, y 9×10^{13} En algunas realizaciones, una dosis eficaz de TIL está en el intervalo de 1×10^6 a 5×10^6, 5×10^6 a 1×10^7, 1×10^7 a 5×10^7, 5×10^7 a 1×10^8, 1×10^8 to 5×10^8, 5×10^8 a 1×10^9, 1×10^9 a 5×10^9, 5×10^9 a 1×10^{10}, 1×10^{10} a 5×10^{10}, 5×10^{10} a 1×10^{11}, 5×10^{11} a 1×10^{12}, 1×10^{12} a 5×10^{12}, y 5×10^{12} a 1×10^{13}.

[1271] En algunas realizaciones, una dosis efectiva de TIL está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 4,3 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3,2 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 1,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,55 mg/kg a aproximadamente 0,85 mg/kg, aproximadamente 0,65 mg/kg a aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 0,75 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,85 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1,85 mg/kg, aproximadamente 1,15 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg a aproximadamente 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,35 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 2,3 mg/kg a aproximadamente 3,4 mg/kg, aproximadamente 2,4 mg/kg a aproximadamente 3,3 mg/kg, aproximadamente 2,6 mg/kg a aproximadamente 3,15 mg/kg, aproximadamente 2,7 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 2,8 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, o aproximadamente 2,85 mg/kg a aproximadamente 2,95 mg/kg.

[1272] En algunas realizaciones, una dosis eficaz de TIL está en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 5 mg a aproximadamente 45 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 40 mg, aproximadamente 15 mg a aproximadamente 35 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 30 mg, aproximadamente 23 mg a aproximadamente 28 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 60 mg a aproximadamente 140 mg, aproximadamente 70 mg a aproximadamente 130 mg, aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, aproximadamente 90 mg a aproximadamente 110 mg, o aproximadamente 95 mg a aproximadamente 105 mg, aproximadamente 98 mg a aproximadamente 102 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 160 mg a aproximadamente 240 mg, aproximadamente 170 mg a aproximadamente 230 mg, de aproximadamente 180 mg a aproximadamente 220 mg, de aproximadamente 190 mg a aproximadamente 210 mg, de aproximadamente 195 mg a aproximadamente 205 mg, o de aproximadamente 198 a aproximadamente 207 mg.

[1273] Una cantidad eficaz de los TIL puede administrarse en dosis únicas o múltiples por cualquiera de los modos aceptados de administración de agentes que tienen utilidades similares, incluidas las vías intranasal y transdérmica, por inyección intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, tópica, por trasplante, o por inhalación.

VII. Métodos de tratamiento de los pacientes

[1274] Los métodos de tratamiento comienzan con la recogida inicial de TIL y el cultivo de TIL. Tales métodos han sido descritos en la técnica por, por ejemplo, Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35(3):283-292. Los métodos de tratamiento se describen en las secciones siguientes, incluidos los Ejemplos.

[1275] Los TIL expandidos producidos según los métodos descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o según las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1) encuentran un uso particular en el tratamiento de pacientes con cáncer (por ejemplo, como se describe en Goff, et al., J. Clinical Oncology, 2016, 34(20):2389-239, así como el contenido suplementario. En algunas realizaciones, los TIL se cultivaron a partir de depósitos resecados de melanoma metastásico como se ha descrito previamente (véase, Dudley, et al., J Immunother., 2003, 26:332-342). El tumor fresco puede diseccionarse en condiciones estériles. Se puede recoger una muestra representativa para un análisis patológico formal. Pueden utilizarse fragmentos individuales de 2 mm^3 a 3 mm^3. En algunas realizaciones, se obtienen 5, 10, 15, 20, 25 o 30 muestras por paciente. En algunas realizaciones, se obtienen 20, 25, o 30 muestras por paciente. En algunas realizaciones, se obtienen 20, 22, 24, 26, o 28 muestras por paciente. En algunas realizaciones, se obtienen 24 muestras por paciente. Las muestras pueden colocarse en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos, mantenerse en medio de crecimiento con altas dosis de IL-

2 (6.000 UI/mL) y monitorizarse para detectar la destrucción del tumor y/o la proliferación de TIL. Cualquier tumor con células viables restantes tras el procesamiento puede ser digerido enzimáticamente en una suspensión unicelular y criopreservado, tal y como se describe en el presente documento.

[1276] **En** algunas realizaciones, los TIL cultivados con éxito pueden ser muestreados para análisis de fenotipo (CD3, CD4, CD8, y CD56) y probados contra tumor autólogo cuando esté disponible. Los TIL pueden considerarse reactivos si en el cocultivo de una noche se obtienen niveles de interferón-gamma (IFN-γ) > 200 pg/mL y el doble del fondo. (Goff, et al., J Immunother., 2010, 33:840-847). En algunas realizaciones, los cultivos con evidencia de reactividad autóloga o patrones de crecimiento suficientes pueden seleccionarse para una segunda expansión (por ejemplo, una segunda expansión como la proporcionada según la Etapa D de la Figura 1), incluyendo segundas expansiones que a veces se denominan expansión rápida (REP). En algunas realizaciones, los TIL expandidos con alta reactividad autóloga (por ejemplo, alta proliferación durante una segunda expansión), se seleccionan para una segunda expansión adicional. En algunas realizaciones, los TIL con alta reactividad autóloga (por ejemplo, alta proliferación durante la segunda expansión según se proporciona en la Etapa D de la Figura 1), se seleccionan para una segunda expansión adicional según la Etapa D de la Figura 1.

[1277] Los fenotipos celulares de las muestras criopreservadas de TIL de bolsa de infusión pueden analizarse por citometría de flujo (p. ej., FlowJo) para los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8, CCR7, y CD45RA (BD BioSciences), así como por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Las citocinas séricas se midieron mediante técnicas estándar de ensayo inmunoenzimático. Un aumento del IFN-g sérico se definió como >100 pg/mL y superior a 4 3 niveles basales.

[1278] En algunas realizaciones, los TIL producidos por los métodos aquí proporcionados, por ejemplo los ejemplificados en la Figura 1, proporcionan una mejora sorprendente en la eficacia clínica de los TIL. En algunas realizaciones, los TIL producidos por los métodos proporcionados en el presente documento, por ejemplo los ejemplificados en la Figura 1, muestran una eficacia clínica aumentada en comparación con los TIL producidos por métodos distintos de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, métodos distintos de los ejemplificados en la Figura 1. En algunas realizaciones, los métodos distintos de los aquí descritos incluyen métodos denominados proceso 1C y/o Generación 1 (Gen 1). En algunas realizaciones, el aumento de la eficacia se mide por DCR, ORR, y/u otras respuestas clínicas. En algunas realizaciones, los TILS producidos por los métodos proporcionados en el presente documento, por ejemplo los ejemplificados en la Figura 1, presentan un tiempo de respuesta y un perfil de seguridad similares en comparación con los TILS producidos por métodos distintos de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, métodos distintos de los ejemplificados en la Figura 1, por ejemplo el proceso Gen 1.

[1279] En algunas realizaciones, el IFN-gamma (IFN-γ) es indicativo de la eficacia del tratamiento y/o de una mayor eficacia clínica. En algunas realizaciones, el IFN-γ en la sangre de sujetos tratados con TILs es indicativo de TILs activos. En algunas realizaciones, se emplea un ensayo de potencia para la producción de IFN-γ. La producción de IFN-γ es otra medida del potencial citotóxico. La producción de IFN-γ puede medirse determinando los niveles de la citocina IFN-γ en la sangre, el suero o los TIL *ex vivo* de un sujeto tratado con TIL preparados por los métodos de la presente invención, incluidos los descritos por ejemplo en la Figura 1. En algunas realizaciones, un aumento del IFN-γ es indicativo de la eficacia del tratamiento en un paciente tratado con los TIL producidos por los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, el IFN-γ se multiplica por uno, por dos, por tres, por cuatro o por cinco o más en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con células TIL preparadas mediante métodos distintos de los que se proporcionan en el presente documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos de los representados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ aumenta una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados utilizando otros métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ aumenta dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados utilizando otros métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ aumenta tres veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados utilizando otros métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ aumenta cuatro veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados utilizando otros métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la secreción de IFN-γ aumenta cinco veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados utilizando otros métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, el IFN-γ se mide utilizando un kit Quantikine ELISA. En algunas realizaciones, el IFN-γ se mide en los TIL *ex vivo* de un sujeto tratado con TIL preparados por los métodos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 1. En algunas realizaciones, el IFN-γ se mide en la sangre de un sujeto tratado con TILs preparadas por los métodos de la presente invención, incluyendo los descritos por ejemplo en la Figura 1. En algunas realizaciones, el IFN-γ se mide en el suero de TILs de un sujeto tratado con TILs preparados por los métodos de la presente invención, incluyendo los descritos por ejemplo en la Figura 1.

[1280] En algunas realizaciones, los TIL preparados por los métodos de la presente invención, incluidos los descritos por

ejemplo en la Figura 1, exhiben mayor policlonalidad en comparación con los TIL producidos por otros métodos, incluidos los no ejemplificados en la Figura 1, como por ejemplo, los métodos denominados métodos del proceso 1C. En algunas realizaciones, la policlonalidad significativamente mejorada y/o la policlonalidad aumentada es indicativa de la eficacia del tratamiento y/o de la eficacia clínica aumentada. En algunas realizaciones, la policlonalidad se refiere a la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, un aumento de la policlonalidad puede ser indicativo de la eficacia del tratamiento con respecto a la administración de los TIL producidos por los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, la policlonalidad aumenta una vez, dos veces, diez veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces en comparación con los TIL preparados utilizando métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incluidos en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad se multiplica por uno en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados usando otros métodos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluyendo por ejemplo, métodos distintos de los representados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad se multiplica por dos en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados usando otros métodos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluyendo por ejemplo, métodos distintos de los representados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad aumenta diez veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados utilizando métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad aumenta 100 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados utilizando métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad aumenta 500 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados utilizando otros métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad aumenta 1000 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados utilizando otros métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1.

[1281] Las medidas de eficacia pueden incluir la tasa de control de la enfermedad (DCR) así como la tasa de respuesta global (ORR), como se conoce en la técnica así como se describe en el presente documento.

1. **Métodos de tratamiento del NSCLC**

[1282] Las composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse en un método para tratar el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en el que el NSCLC es refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anit-PD-1 incluye, p. ej, entre otros, nivolumab (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), pembrolizumab (lambrolizumab, MK03475 o MK-3475, Merck; Keytruda®), anticuerpo humanizado anti-PD-1 JS001 (ShangHai JunShi), anticuerpo monoclonal anti-PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), Pidilizumab (mAb anti-PD-1 CT-011, Medivation), anticuerpo monoclonal anti-PD-1 BGB-A317 (BeiGene), y/o anticuerpo anti-PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), anticuerpo monoclonal humano REGN2810 (Regeneron), anticuerpo monoclonal humano MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb), y/o anticuerpo humanizado anti-PD-1 IgG4 PDR001 (Novartis). En algunas realizaciones, el anticuerpo PD-1 es del clon: RMP1-14 (rat IgG) - BioXcell cat# BP0146. Otros anticuerpos adecuados para su uso en métodos de coadministración con TIL producidos según las Etapas A a F descritos en el presente documento son los anticuerpos anti-PD-1 divulgados en el documento Patente de EE.UU. N.º 8,008,449. En algunas realizaciones, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a PD-L1 e inhibe su interacción con PD-1, aumentando así la actividad inmunitaria. Se incluye cualquier anticuerpo conocido en la técnica que se una a PD-L1 e interrumpa la interacción entre PD-1 y PD-L1, y estimule una respuesta inmu2740274ne antitumoral. Por ejemplo, entre los anticuerpos dirigidos contra PD-L1 y en fase de ensayo clínico se encuentran BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) y MPDL3280A (Genentech). Otros anticuerpos adecuados dirigidos contra PD-L1 se describen en Patente de EE. UU. N.º 7,943,743. Un experto comprenderá que se incluye cualquier anticuerpo que se una a PD-1 o PD-L1, interrumpa la interacción PD-1/PD-L1 y estimule una respuesta inmunitaria antitumoral.

[1283] En algunas realizaciones, el NSCLC es refractario al anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y a un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el NSCLC es refractario al anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y a la quimioterapia, donde el agente quimioterapéutico es carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, cisplatino. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab (Yervoy®).

[1284] En algunas realizaciones, el NSCLC es refractario al tratamiento con PD-1 combinado (incluyendo, por ejemplo, pembrolizumab) y un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el(los) agente(s) quimioterapéutico(s) es(son) un agente quimioterapéutico de doblete de platino. En algunas realizaciones, la terapia de doblete de platino comprende un primer agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en cisplatino y carboplatino y un segundo agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en vinorelbina, gemcitabina y un taxano (incluyendo, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel o nab-paclitaxel). En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico doblete de platino se combina con pemetrexed.

[1285] En algunas realizaciones, el NSCLC es refractario a un tratamiento de combinación o terapia de combinación que comprende un anti-PD-1 y un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, JS001, TSR-042, pidilizumab, (BGB-A317, SHR-

1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, anti-PD-1 del clon: RMP1-14, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en Patente de EE. UU. n.º 8.008.449, durvalumab, atezolizumab, avelumab, y fragmentos, derivados, variantes, así como biosimilares de los mismos. En algunas realizaciones, el anti-PD-1 es pembrolizumab. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un agente quimioterapéutico de doblete de platino. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico se combina con pemetrexed. En algunas realizaciones, el NSCLC es refractario a una terapia de combinación que comprende carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, y cisplatino. En algunas realizaciones, el NSCLC es refractario a una terapia de combinación que comprende carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, cisplatino, nivolumab, e ipilimumab.

[1286] En algunas realizaciones, el NSCLC es refractario a una terapia de combinación que comprende el anti-PD-1 o el anti-PD-L1 y una terapia de doblete de platino, en la que la terapia de doblete de platino comprende:

i) un primer agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en cisplatino y carboplatino,

ii) y un segundo agente quimioterapéutico seleccionado del grupo formado por vinorelbina, gemcitabina y un taxano (incluyendo, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel o nab-paclitaxel).

[1287] En algunas realizaciones, el NSCLC es refractario a una terapia de combinación que comprende el anti-PD-1 o el anti-PD-L1, pemetrexed y una terapia de doblete de platino, en la que la terapia de doblete de platino comprende:

i) un primer agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en cisplatino y carboplatino,

ii) y un segundo agente quimioterapéutico seleccionado del grupo formado por vinorelbina, gemcitabina y un taxano (incluyendo, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel o nab-paclitaxel).

[1288] En algunas realizaciones, el NSCLC ha sido tratado con un anticuerpo anti-PD-1. En algunas realizaciones, el NSCLC ha sido tratado con un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas realizaciones, el sujeto con NSCLC no ha recibido tratamiento. En algunas realizaciones, el NSCLC no ha sido tratado con un anticuerpo anti-PD-1. En algunas realizaciones, el NSCLC no ha sido tratado con un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas realizaciones, el NSCLC ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el NSCLC ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico pero ya no está siendo tratado con el agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el paciente con NSCLC es *naive* anti-PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, el sujeto con NSCLC tiene baja expresión de PD-L1. En algunas realizaciones, el sujeto con NSCLC tiene un NSCLC ingenuo al tratamiento o es postratamiento quimioterapéutico pero ingenuo a anti-PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, el sujeto con NSCLC es un NSCLC *naive* o post-tratamiento quimioterápico pero *naive* anti-PD-1/PD-L1 y tiene baja expresión de PD-L1. En algunas realizaciones, el sujeto con NSCLC tiene una enfermedad voluminosa al inicio del estudio. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una enfermedad voluminosa al inicio del estudio y una baja expresión de PD-L1. En algunas realizaciones, el sujeto con NSCLC tiene un NSCLC *naive* al tratamiento o post quimioterapia (por ejemplo, post agente quimioterapéutico) pero *naive* anti-PD-1/PD-L1 que tiene baja expresión de PD-L1 y/o tiene enfermedad voluminosa al inicio. En algunas realizaciones, la enfermedad voluminosa está indicada cuando el diámetro máximo del tumor es superior a 7 cm medidos en el plano transversal o coronal. En algunas realizaciones, la enfermedad voluminosa está indicada cuando hay ganglios linfáticos inflamados con un diámetro de eje corto de 20 mm o superior. En algunas realizaciones, el quimioterapéutico incluye un tratamiento estándar para el NSCLC.

[1289] **En** algunas realizaciones, los TIL preparados por los métodos de la presente invención, incluidos las descritos por ejemplo en la Figura 1, exhiben mayor policlonalidad en comparación con los TIL producidos por otros métodos, incluidos los no ejemplificados en la Figura 1, como por ejemplo, los métodos denominados métodos del proceso 1C. En algunas realizaciones, la policlonalidad significativamente mejorada y/o la policlonalidad aumentada es indicativa de la eficacia del tratamiento y/o de la eficacia clínica aumentada para el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, la policlonalidad se refiere a la diversidad del repertorio de células T. En algunas realizaciones, un aumento de la policlonalidad puede ser indicativo de la eficacia del tratamiento con respecto a la administración de los TIL producidos por los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, la policlonalidad aumenta una vez, dos veces, diez veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces en comparación con los TIL preparados utilizando métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incluidos en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad se multiplica por uno en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados usando otros métodos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluyendo por ejemplo, métodos distintos de los representados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad se multiplica por dos en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados usando otros métodos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluyendo por ejemplo, métodos distintos de los representados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad aumenta diez veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados utilizando métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad aumenta 100 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados utilizando métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad aumenta 500 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado

con TILs preparados utilizando otros métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1. En algunas realizaciones, la policlonalidad aumenta 1000 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TILs preparados utilizando otros métodos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, métodos distintos a los incorporados en la Figura 1.

a. Inhibidores de PD-1 y PD-L1

[1290] La muerte programada 1 (PD-1) es una proteína receptora transmembrana de 288 aminoácidos que se expresa en células T, células B, células T natural killer (NK), monocitos activados, y células dendríticas. La PD-1, también conocida como CD279, pertenece a la familia CD28 y en los humanos está codificada por el gen *Pdcd1* del cromosoma 2. La PD-1 consta de un dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), una región transmembrana y un dominio intracelular que contiene un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) y un motivo interruptor basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM). Se sabe que PD-1 y sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) desempeñan un papel clave en la tolerancia inmunitaria, como se describe en Keir, et al., Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 677-704. PD-1 proporciona señales inhibitorias que regulan negativamente las respuestas inmunitarias de las células T. PD-L1 (también conocido como B7-H1 o CD274) y PD-L2 (también conocido como B7-DC o CD273) se expresan en células tumorales y células estromales, que pueden ser encontradas por células T activadas que expresan PD-1, lo que conduce a la inmunosupresión de las células T. PD-L1 es una proteína transmembrana de 290 aminoácidos codificada por el gen *Cd274* del cromosoma 9 humano. El bloqueo de la interacción entre PD-1 y sus ligandos PD-L1 y PD-L2 mediante el uso de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1 y/o un inhibidor de PD-L2 puede superar la resistencia inmunitaria, como se ha demostrado en estudios clínicos recientes, como el descrito en Topalian, et al., N. Eng. J. Med. 2012, 366, 2443-54. PD-L1 se expresa en muchas líneas celulares tumorales, mientras que PD-L2 se expresa sobre todo en células dendríticas y en unas pocas líneas tumorales. Además de las células T (que expresan PD-1 de forma inducida tras la activación), PD-1 también se expresa en células B, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos activados, y células dendríticas.

[1291] En una realización, el inhibidor de PD-1 puede ser cualquier inhibidor de PD-1 o bloqueador de PD-1 conocido en la técnica. En particular, se trata de uno de los inhibidores o bloqueadores de PD-1 descritos con más detalle en los párrafos siguientes. Los términos "inhibidor", "antagonista" y "bloqueador" se utilizan indistintamente en el presente documento en referencia a los inhibidores de PD-1. Para evitar dudas, las referencias en el presente documento a un inhibidor de PD-1 que es un anticuerpo pueden referirse a un compuesto o fragmentos de unión a antígeno, variantes, conjugados o biosimilares de los mismos. Para evitar dudas, las referencias en el presente documento a un inhibidor de PD-1 también pueden referirse a un compuesto de molécula pequeña o a una sal, éster, solvato, hidrato, cocristal, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

[1292] En una realización preferida, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo *(es decir,* un anticuerpo anti-PD-1), un fragmento del mismo, incluidos fragmentos Fab, o un fragmento variable de cadena única (scFv) del mismo. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo policlonal. En una realización preferida, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 compite por la unión con PD-1, y/o se une a un epítopo de PD-1. En una realización, el anticuerpo compite por la unión con PD-1, y/o se une a un epítopo en PD-1.

[1293] En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es uno que se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 100 pM o menor, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 90 pM o menor, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 80 pM o menor, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 70 pM o menor, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 60 pM o menor, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 50 pM o inferior, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 40 pM o inferior, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 30 pM o inferior, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 20 pM o inferior, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 10 pM o inferior, o se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 1 pM o inferior.

[1294] En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es uno que se une a PD-1 humano con un k_{assoc} de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ 1/M·s o más rápido, se une a PD-1 humano con un k_{assoc} de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ 1/M·s o más rápido, se une a PD-1 humano con un k_{assoc} de aproximadamente 8×10^5 1/M·s o más rápido, se une a PD-1 humano con un k_{assoc} de aproximadamente $8,5 \times 10^5$ 1/M·s o más rápido, se une a PD-1 humano con un k_{assoc} de aproximadamente 9×10^5 1/M·s o más rápido, se une a PD-1 humano con un k_{assoc} de aproximadamente $9,5 \times 10^5$ l/M·s o más rápido, o se une al PD-1 humano con un k_{assoc} de aproximadamente 1×10^6 1/M·s o más rápido.

[1295] En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es uno que se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente 2×10^{-5} 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,1 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,2 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,3 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,4 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,5 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,6 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento o se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,8 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,9 \times 10^{-5}$ 1/s o más lento, o se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente 3×10^{-5} 1/s o más lento.

[1296] En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es uno que bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o inferior, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o inferior, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o inferior, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o inferior, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o inferior, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o inferior, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o inferior, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o inferior, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o inferior, o bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o inferior.

[1297] En una realización, el inhibidor de PD-1 es nivolumab (disponible comercialmente como OPDIVO de Bristol-Myers Squibb Co.), o biosimilares, fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. El nivolumab es un anticuerpo IgG4 totalmente humano que bloquea el receptor PD-1. En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo de inmunoglobulina G4 kappa, anti-(CD274 humano). El nivolumab tiene asignado el número de registro 946414-94-4 del Chemical Abstracts Service (CAS) y también se conoce como 5C4, BMS-936558, MDX-1106, y ONO-4538. La preparación y las propiedades de nivolumab se describen en Patente de EE.UU. n.º 8.008.449 y Publicación Internacional de Patentes n.º WO 2006/121168. La seguridad y eficacia clínicas de nivolumab en diversas formas de cáncer se han descrito en Wang, et al., Cancer Immunol Res. 2014, 2, 846-56; Page, et al., Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185-202; y Weber, et al., J. Clin. Oncology, 2013, 31, 4311-4318. Las secuencias de aminoácidos de nivolumab se exponen en la Tabla 48. El nivolumab tiene enlaces disulfuro intracadena pesada en 22-96,140-196, 254-314, 360-418, 22''-96'', 140''-196'', 254''-314'' y 360''-418''; enlaces disulfuro intracadena ligera en 23'-88', 134'-194', 23'''-88''', y 134'''-194'''; enlaces disulfuro entre cadenas ligeras-pesadas en 127-214', 127''-214''', enlaces disulfuro entre cadenas pesadas-pesadas en 219-219'' y 222-222''; y sitios de N-glicosilación (H CH_2 84.4) a 290, 290''.

[1298] En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:463 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:464. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:463 y SEQ ID NO.º464, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes o conjugados de los mismos. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:463 y SEQ ID N.º:464, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:463 y SEQ ID N.º:464, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:463 y SEQ ID N.º:464, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:463 y SEQ ID N.º:464, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:463 y SEQ ID N.º:464, respectivamente.

[1299] En una realización, el inhibidor de PD-1 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de nivolumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:465, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:466, y sustituciones aminoacídicas conservativas de la misma. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:465 y SEQ ID N.º:466, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:465 y SEQ ID N.º:466, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:465 y SEQ ID N.º:466, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:465 y SEQ ID N.º:466, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:465 y SEQ ID N.º:466, respectivamente.

[1300] En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:467, SEQ ID N.º:468, y SEQ ID N.º:469, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:470, SEQ ID N.º:471, y SEQ ID N.º:472, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas. En una realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítopo en PD-1 que cualquiera de los anticuerpos antes mencionados.

[1301] En una realización, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a nivolumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, por ejemplo, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un

medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es nivolumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-1 autorizado o presentado para autorización, en el que el anticuerpo anti-PD-1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es nivolumab. El anticuerpo anti-PD-1 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es nivolumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es nivolumab.

TABLA 35: Secuencias de aminoácidos de los inhibidores de PD-1 relacionados con nivolumab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 463 nivolumab cadena pesada	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º 464 nivolumab cadena ligera	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º 465 nivolumab cadena pesada variable	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º 466 nivolumab cadena ligera variable	[illegible]	[illegible]
SEQ ID N.º 467 nivolumab cadena pesada CDR1	NSGMH	5
SEQ ID N.º 468 nivolumab cadena pesada CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG	17
SEQ ID N.º 469 nivolumab cadena pesada CDR3	NDDY	4
SEQ ID N.º 470 nivolumab cadena ligera CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID N.º 471 nivolumab cadena ligera CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID N.º 472 nivolumab cadena ligera CDR3	QQSSNWPRT	9

[1302] En otra realización, el inhibidor de PD-1 comprende pembrolizumab (comercialmente disponible como KEYTRUDA de Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, EE.UU.), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes del mismo. Pembrolizumab tiene asignado el número de registro CAS 1374853-91-4 y también se conoce como lambrolizumab, MK-3475 y SCH-900475. Pembrolizumab tiene una estructura de dímero de inmunoglobulina G4, anti-(proteína humana PDCD1 (muerte celular programada 1)) (cadena pesada monoclonal humana-Mus musculus), disulfuro con cadena ligera monoclonal humana-Mus musculus. La estructura del pembrolizumab también puede describirse como inmunoglobulina G4, anti-(muerte celular programada humana 1); monoclonal de ratón humanizado [228-L-prolina(H10-S>P)]γ4 cadena pesada (134-218')-disulfuro con monoclonal de ratón humanizado κ cadena ligera dímero (226-226":229-229")-bisdisulfuro. Las propiedades, usos y preparación del pembrolizumab se describen en la Publicación de Patente Internacional nº WO 2008/156712 A1, Patente de EE. UU. N.º 8,354,509 y Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. US 2010/0266617 A1, US 2013/0108651 A1, y US 2013/0109843 A2. La seguridad y eficacia clínicas de pembrolizumab en diversas formas de cáncer se describen en Fuerst, Oncology Times, 2014, 36, 35-36; Robert, et al., Lancet, 2014, 384, 1109-17; y Thomas, et al., Exp. Opin. Biol. Ther, 2014, 14, 1061-1064. Las secuencias de aminoácidos de pembrolizumab se exponen en la Tabla 49. Pembrolizumab incluye los siguientes puentes disulfuro: 22-96, 22"-96", 23'-92', 23'"-92'", 134-218', 134"-218'", 138'-198', 138'"-198'", 147-203, 147"-203", 226-226", 229-229", 261-321, 261"-321", 367-425, y 367"-425", y los siguientes sitios de glicosilación (N): Asn-297 y Asn-297". El pembrolizumab es un isotipo IgG4/kappa con una mutación estabilizadora S228P en la región Fc; la inserción de esta mutación en la región bisagra IgG4 impide la formación de medias moléculas típicamente observada en los anticuerpos IgG4. Pembrolizumab está

heterogéneamente glicosilado en Asn297 dentro del dominio Fc de cada cadena pesada, lo que da un peso molecular de aproximadamente 149 kDa para el anticuerpo intacto. La glicoforma dominante del pembrolizumab es la forma de glicano agalacto diantenario fucosilado (G0F).

[1303] En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:473 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:474. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:473 y SEQ ID NO.º474, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes o conjugados de los mismos. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:473 y SEQ ID N.º:474, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:473 y SEQ ID N.º:474, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:473 y SEQ ID N.º:474, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:473 y SEQ ID N.º:474, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:473 y SEQ ID N.º:474, respectivamente.

[1304] En una realización, el inhibidor de PD-1 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de pembrolizumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:475, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:476, y sustituciones aminoacídicas conservativas de la misma. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:475 y SEQ ID N.º:476, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:475 y SEQ ID N.º:476, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:475 y SEQ ID N.º:476, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:475 y SEQ ID N.º:476, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:475 y SEQ ID N.º:476, respectivamente.

[1305] En una realización, un inhibidor de PD-1 comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:477, SEQ ID N.º:478, y SEQ ID N.º:479, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:480, SEQ ID N.º:481, y SEQ ID N.º:482, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas. En una realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítopo en PD-1 que cualquiera de los anticuerpos antes mencionados.

[1306] En una realización, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a pembrolizumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, por ejemplo, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es pembrolizumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-1 autorizado o presentado para autorización, en el que el anticuerpo anti-PD-1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es pembrolizumab. El anticuerpo anti-PD-1 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es pembrolizumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es pembrolizumab.

TABLA 36: Secuencias de aminoácidos de los inhibidores de PD-1 relacionados con pembrolizumab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 473 pembrolizumab cadena pesada	[illegible]	449
SEQ ID N.º 474 pembrolizumab cadena ligera	[illegible]	214
SEQ ID N.º 475 pembrolizumab cadena pesada variable	[illegible]	120
SEQ ID N.º 476 pembrolizumab cadena ligera variable	[illegible]	113
SEQ ID N.º 477 pembrolizumab cadena pesada CDR1	NYYMY	5
SEQ ID N.º 478 pembrolizumab cadena pesada CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK	16
SEQ ID N.º 479 pembrolizumab cadena pesada CDR3	RDYRFDMGFD Y	11
SEQ ID N.º 480 pembrolizumab cadena ligera CDR1	RASKGVSTSG YSYLH	15
SEQ ID N.º 481 pembrolizumab cadena ligera CDR2	LASYLES	7
SEQ ID N.º 482 pembrolizumab cadena ligera CDR3	QHSRDLPLT	9

[1307] En una realización, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 disponible comercialmente, como los clones anti-m-PD-1 J43 (Cat # BE0033-2) y RMP1-14 (Cat # BE0146) (Bio X Cell, Inc., West Lebanon, NH, USA). Los expertos en la técnica conocen varios anticuerpos anti-PD-1 disponibles en el mercado.

[1308] En una realización, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo divulgado en Patente de EE.UU. nº 8.354.509 o Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. 2010/0266617 A1, 2013/0108651 A1, 2013/0109843 A2. En una realización, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en Patentes de EE.UU. N.º 8,287,856, 8,580,247, y 8,168,757 y Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. 2009/0028857 A1, 2010/0285013 A1, 2013/0022600 A1, y 2011/0008369 A1. En otra realización, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en Patente de EE.UU. n.º 8.735.553 B1. En una realización, el inhibidor de PD-1 es pidilizumab, también conocido como CT-011, que se describe en Patente de EE. UU. N.º 8,686,119.

[1309] En una realización, el inhibidor de PD-1 puede ser una molécula pequeña o un péptido, o un derivado peptídico, como los descritos en Patentes de EE.UU. N.º 8,907,053; 9,096,642; y 9,044,442 y Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2015/0087581; compuestos de 1,2,4-oxadiazol y derivados como los descritos en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2015/0073024; compuestos peptidomiméticos cíclicos y derivados como los descritos en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2015/0073042; compuestos cíclicos y derivados como los descritos en Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2015/0125491; compuestos de 1,3,4-oxadiazol y 1,3,4-tiadiazol y derivados tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2015/033301; compuestos basados en péptidos y derivados tales como los descritos en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 2015/036927 y WO 2015/04490, o unos compuestos y derivados basados en péptidos macrocíclicos como los descritos en Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º US 2014/0294898..

[1310] En una realización, el inhibidor de PD-L1 o PD-L2 puede ser cualquier inhibidor, antagonista o bloqueador de PD-L1 o PD-L2 conocido en la técnica. En particular, es uno de los inhibidores, antagonistas o bloqueadores de PD-L1 o PD-L2 descritos con más detalle en los párrafos siguientes. Los términos "inhibidor", "antagonista" y "bloqueador" se utilizan indistintamente en el presente documento en referencia a los inhibidores de PD-L1 y PD-L2. Para evitar dudas, las referencias en el presente documento a un inhibidor de PD-L1 o PD-L2 que es un anticuerpo pueden referirse a un compuesto o fragmentos de unión a antígeno, variantes, conjugados o biosimilares de los mismos. Para evitar dudas, las referencias en el presente documento a un inhibidor de PD-L1 o PD-L2 pueden referirse a un compuesto o a una sal, éster, solvato, hidrato, cocristal, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

[1311] En algunas realizaciones, las composiciones, procesos y métodos aquí descritos incluyen un inhibidor de PD-L1 o

PD-L2. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 o PD-L2 es una molécula pequeña. En una realización preferida, el inhibidor de PD-L1 o PD-L2 es un anticuerpo *(es decir,* un anticuerpo anti-PD-1), un fragmento del mismo, incluidos fragmentos Fab, o un fragmento variable de cadena única (scFv) del mismo. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 o PD-L2 es un anticuerpo policlonal. En una realización preferida, el inhibidor de PD-L1 o PD-L2 es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 o PD-L2 compite por unirse a PD-L1 o PD-L2, y/o se une a un epítopo de PD-L1 o PD-L2. En una realización, el anticuerpo compite por la unión con PD-L1 o PD-L2, y/o se une a un epítopo de PD-L1 o PD-L2.

[1312] En algunas realizaciones, los inhibidores de PD-L1 proporcionados en el presente documento son selectivos para PD-L1, en el sentido de que los compuestos se unen o interactúan con PD-L1 a concentraciones sustancialmente inferiores a las que se unen o interactúan con otros receptores, incluido el receptor PD-L2. En ciertas realizaciones, los compuestos se unen al receptor PD-L1 a una constante de unión que es al menos aproximadamente 2 veces mayor concentración, aproximadamente 3 veces mayor concentración, aproximadamente 5 veces mayor concentración, aproximadamente 10 veces mayor concentración, aproximadamente 20 veces mayor concentración, aproximadamente 30 veces mayor concentración, aproximadamente 50 veces mayor concentración, aproximadamente 100 veces mayor concentración, aproximadamente 200 veces mayor concentración, aproximadamente 300 veces mayor concentración, o aproximadamente 500 veces mayor concentración que al receptor PD-L2.

[1313] En algunas realizaciones, los inhibidores de PD-L2 proporcionados en el presente documento son selectivos para PD-L2, en el sentido de que los compuestos se unen o interactúan con PD-L2 a concentraciones sustancialmente inferiores a las que se unen o interactúan con otros receptores, incluido el receptor PD-L1. En ciertas realizaciones, los compuestos se unen al receptor PD-L2 a una constante de unión que es al menos aproximadamente 2 veces mayor concentración, aproximadamente 3 veces mayor concentración, aproximadamente 5 veces mayor concentración, aproximadamente 10 veces mayor concentración, aproximadamente 20 veces mayor concentración, aproximadamente 30 veces mayor concentración, aproximadamente 50 veces mayor concentración, aproximadamente 100 veces mayor concentración, aproximadamente 200 veces mayor concentración, aproximadamente 300 veces mayor concentración, o aproximadamente 500 veces mayor concentración que al receptor PD-L1.

[1314] Sin estar atado a ninguna teoría, se cree que las células tumorales expresan PD-L1 y que las células T expresan PD-1. Sin embargo, la expresión de PD-L1 por las células tumorales no es necesaria para la eficacia de los inhibidores o bloqueadores de PD-1 o PD-L1. En una realización, las células tumorales expresan PD-L1. En otra realización, las células tumorales no expresan PD-L1. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir una combinación de un anticuerpo PD-1 y un anticuerpo PD-L1, como los descritos en el presente documento, en combinación con un TIL. La administración de una combinación de un anticuerpo PD-1 y PD-L1 y un TIL puede ser simultánea o secuencial.

[1315] En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 y/o PD-L2 es uno que se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 100 pM o inferior, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 90 pM o inferior, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 80 pM o inferior, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 70 pM o inferior, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 60 pM o inferior, una K_D de aproximadamente 50 pM o inferior, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 40 pM o inferior, o se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de alrededor de las 30 pM o menos,

[1316] En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 y/o PD-L2 es uno que se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con un k_{assoc} de aproximadamente 7,5 × 10^5 1/M·s o más rápido, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con un k_{assoc} de aproximadamente 8 × 10^5 1/M·s o más rápido, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con un k_{assoc} de aproximadamente 8,5 × 10^5 1/M·s o más rápido, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con un k_{assoc} de aproximadamente 9 × 10^5 1/M·s o más rápido, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con un k_{assoc} de aproximadamente 9,5 × 10^5 1/M·s y/o más rápido, o se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con un k_{assoc} de aproximadamente 1 × 10^6 1/M·s o más rápido.

[1317] En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 y/o PD-L2 es uno que se une a PD-L1 o PD-L2 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente 2 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,1 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,2 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,3 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,4 × 10^{-5} 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,5 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une a PD-1 humano con una k_{dissoc}c de aproximadamente 2,6 × 10^{-5} 1/s o más lento, se une a PD-L1 o PD-L2 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente 2,7 × 10^{-5} 1/s o más lento, o se une a PD-L1 o PD-L2 humano con una k_{dissoc} de aproximadamente 3 × 10^{-5} 1/s o más lento.

[1318] En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 y/o PD-L2 es uno que bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o inferior; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o inferior; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o inferior; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o inferior; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o inferior; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o

inferior; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o inferior; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o inferior; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o inferior; o bloquea PD-1 humana, o bloquea la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o inferior.

[1319] En una realización, el inhibidor de PD-L1 es durvalumab, también conocido como MEDI4736 (disponible comercialmente en Medimmune, LLC, Gaithersburg, Maryland, una filial de AstraZeneca plc), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados, o variantes del mismo. En una realización, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo divulgado en Patente de EE.UU. nº 8.779.108 o Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2013/0034559. La eficacia clínica de durvalumab se ha descrito en Page, et al., Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185-202; Brahmer, et al., J. Clin. Oncol. 2014, 32, 5s (supplement, abstract 8021); and McDermott, et al., Cancer Treatment Rev., 2014, 40, 1056-64. La preparación y las propiedades de durvalumab se describen en Patente de EE. UU. N.º 8,779,108. Las secuencias de aminoácidos de durvalumab se exponen en la Tabla 50. El anticuerpo monoclonal durvalumab incluye enlaces disulfuro en 22-96, 22''-96'', 23'-89', 23'''-89''', 135'-195', 135'''-195''', 148-204, 148''-204'', 215'-224, 215'''-224'', 230-230'', 233-233'', 265-325, 265''-325'', 371-429, y 371''-429'; y sitios de N-glicosilación en Asn-301 y Asn-301''.

[1320] En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:483 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:484. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:483 y SEQ ID N.º:484, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes o conjugados de los mismos. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:483 y SEQ ID N.º:484, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:483 y SEQ ID N.º:484, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:483 y SEQ ID N.º:484, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:483 y SEQ ID N.º:484, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:483 y SEQ ID N.º:484, respectivamente.

[1321] En una realización, el inhibidor de PD-L1 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de durvalumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-L1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:485, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-L1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:486, y sustituciones de aminoácidos conservativas de la misma. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:485 y SEQ ID N.º:486, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:485 y SEQ ID N.º:486, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:485 y SEQ ID N.º:486, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:485 y SEQ ID N.º:486, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:485 y SEQ ID N.º:486, respectivamente.

[1322] En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:487, SEQ ID N.º:488, y SEQ ID N.º:489, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:490, SEQ ID N.º:491, y SEQ ID N.º:492, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas. En una realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítopo en PD-L1 que cualquiera de los anticuerpos antes mencionados.

[1323] En una realización, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-L1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a durvalumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo,* 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es durvalumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-L1 autorizado o presentado para autorización, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es durvalumab. El anticuerpo anti-PD-L1 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos, como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son

iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es durvalumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es durvalumab.

TABLA 37: Secuencias de aminoácidos de los inhibidores de PD-L1 relacionados con durvalumab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 483 durvalumab cadena pesada	[illegible]	
SEQ ID N.º 484 durvalumab cadena ligera	[illegible]	
SEQ ID N.º 485 durvalumab cadena pesada variable	[illegible]	
SEQ ID N.º 486 durvalumab cadena ligera variable	[illegible]	
SEQ ID N.º 487 durvalumab cadena pesada CDR1	RYWMS	5
SEQ ID N.º 488 durvalumab cadena pesada CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
SEQ ID N.º 489 durvalumab cadena pesada CDR3	EGGWFGELAF DY	12
SEQ ID N.º 490 durvalumab cadena ligera CDR1	RASQRVSSSY LA	12
SEQ ID N.º 491 durvalumab cadena ligera CDR2	DASSRAT	7
SEQ ID N.º 492 durvalumab cadena ligera CDR3	QQYGSLPWT	9

[1324] En una realización, el inhibidor de PD-L1 es avelumab, también conocido como MSB0010718C (disponible comercialmente en Merck KGaA/EMD Serono), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes del mismo. La preparación y las propiedades de avelumab se describen en Publicación de solicitud de EE.UU. de patente n.º US 2014/0341917 A1. Las secuencias de aminoácidos de avelumab se exponen en la Tabla 51. El avelumab tiene enlaces disulfuro intracadena pesada (C23-C104) en 22-96, 147-203, 264-324, 370-428, 22''-96'', 147''-203'', 264''-324'', y 370''-428''; enlaces disulfuro intracadena ligera (C23-C104) en 22'-90', 138'-197', 22‴-90‴, y 138‴-197‴; enlaces disulfuro intracadena ligera-pesada (h 5-CL 126) en 223-215' y 223''-215‴; enlaces disulfuro intracadena pesada-pesada (h 11, h 14) en 229-229'' y 232-232''; sitios de N-glicosilación (H CH_2 N84.4) a 300, 300''; glicanos bi-antenarios complejos fucosilados de tipo CHO; y recorte de lisina C-terminal H CHS K2 a 450 y 450'.

[1325] En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:493 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:494. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:493 y SEQ ID N.º:494, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes o conjugados de los mismos. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:493 y SEQ ID N.º:494, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:493 y SEQ ID N.º:494, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas

pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:493 y SEQ ID N.º:494, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:493 y SEQ ID N.º:494, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:493 y SEQ ID N.º:494, respectivamente.

[1326] En una realización, el inhibidor de PD-L1 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de avelumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-L1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:495, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-L1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:496, y sustituciones de aminoácidos conservativas de la misma. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:495 y SEQ ID N.º:496, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:496 y SEQ ID N.º:496, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:495 y SEQ ID N.º:496, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:495 y SEQ ID N.º:496, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:495 y SEQ ID N.º:496, respectivamente.

[1327] En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:497, SEQ ID N.º:498, y SEQ ID N.º:499, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:500, SEQ ID N.º:501, y SEQ ID N.º:502, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas. En una realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítopo en PD-L1 que cualquiera de los anticuerpos antes mencionados.

[1328] En una realización, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-L1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a avelumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, *por ejemplo,* 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es avelumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-L1 autorizado o presentado para autorización, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es avelumab. El anticuerpo anti-PD-L1 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos, como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es avelumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es avelumab.

TABLA 38: Secuencias de aminoácidos de los inhibidores de PD-L1 relacionados con avelumab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 493 avelumab cadena pesada	[illegible]	450
SEQ ID N.º 494 avelumab cadena ligera	[illegible]	216
SEQ ID N.º 495: avelumab cadena pesada variable	[illegible]	120
SEQ ID N.º 496 avelumab cadena ligera variable	[illegible]	116
SEQ ID N.º 497 avelumab cadena pesada CDR1	SYIMM	5
SEQ ID N.º 498 avelumab cadena pesada CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG	17
SEQ ID N.º 499 avelumab cadena pesada CDR3	IKLGTVTTVD Y	11
SEQ ID N.º:500 avelumab cadena ligera CDR1	TGTSSDVGGY NYVS	14
SEQ ID N.º 501 avelumab cadena ligera CDR2	DVSNRPS	7
SEQ ID N.º 502 avelumab cadena ligera CDR3	SSYTSSSTRV	10

[1329] En una realización, el inhibidor de PD-L1 es atezolizumab, también conocido como MPDL3280A o RG7446 (disponible comercialmente como TECENTRIQ de Genentech, Inc., una filial de Roche Holding AG, Basilea, Suiza), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes del mismo. En una realización, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo divulgado en Patente de EE. UU. N.º 8,217,149. En una realización, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo divulgado en Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. 2010/0203056 A1, 2013/0045200 A1, 2013/0045201 A1, 2013/0045202 A1, o 2014/0065135 A1. La preparación y las propiedades del atezolizumab se describen en Patente de EE. UU. N.º 8,217,149. Las secuencias de aminoácidos del atezolizumab se exponen en la Tabla 52. El atezolizumab tiene enlaces disulfuro intracadena pesada (C23-C104) en 22-96, 145-201, 262-322, 368-426, 22''-96'', 145''-201'', 262''-322'', y 368''-426''; enlaces disulfuro intracadena ligera (C23-C104) en 23'-88', 134'-194', 23'''-88''', y 134'''-194'''; enlaces disulfuro intracadena ligera pesada (h 5-CL 126) en 221-214' y 221''-214'''; enlaces disulfuro intracadena pesada-pesada (h 11, h 14) en 227-227'' y 230-230''; y sitios de N-glicosilación (H CH_2 N84.4>A) a 298 y 298'.

[1330] En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende una cadena pesada dada por SEQ ID N.º:503 y una cadena ligera dada por SEQ ID N.º:504. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:503 y SEQ ID N.º:504, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena única (scFv), variantes o conjugados de los mismos. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:503 y SEQ ID N.º:504, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:503 y SEQ ID N.º:504, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:503 y SEQ ID N.º:504, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:503 y SEQ ID N.º:504, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:503 y SEQ ID N.º:504, respectivamente.

[1331] En una realización, el inhibidor de PD-L1 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR)

de atezolizumab. En una realización, la región variable de la cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-L1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:505, y la región variable de la cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-L1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N.º:506, y sustituciones de aminoácidos conservativas de la misma. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:505 y SEQ ID N.º:506, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:505 y SEQ ID N.º:506, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:505 y SEQ ID N.º:506, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:505 y SEQ ID N.º:506, respectivamente. En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID N.º:505 y SEQ ID N.º:506, respectivamente.

[1332] En una realización, un inhibidor de PD-L1 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:507, SEQ ID N.º:508, y SEQ ID N.º:509, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en SEQ ID N.º:510, SEQ ID N.º:511, y SEQ ID N.º:512, respectivamente, y sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas. En una realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítopo en PD-L1 que cualquiera de los anticuerpos antes mencionados.

[1333] En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-L1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia al atezolizumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia, por ejemplo, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es atezolizumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de las siguientes: glicosilación, oxidación, desamidación, y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-L1 autorizado o presentado para autorización, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en el que el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es atezolizumab. El anticuerpo anti-PD-L1 puede ser autorizado por una autoridad reguladora de fármacos, como la FDA de los EE. UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es atezolizumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende además uno o más excipientes, donde el uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, donde el medicamento de referencia o producto biológico de referencia es atezolizumab.

TABLA 39. Secuencias de aminoácidos para inhibidores de PD-L1 relacionados con atezolizumab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de una Letra)	
SEQ ID N.º 503 atezolizumab cadena pesada	[illegible]	448
SEQ ID N.º 504 atezolizumab cadena ligera	[illegible]	214
SEQ ID N.º 505 atezolizumab cadena pesada variable	[illegible]	118
SEQ ID N.º 506 atezolizumab cadena ligera variable	[illegible]	108
SEQ ID N.º 507 atezolizumab cadena pesada CDR1	GFTFSDSWIH	10
SEQ ID N.º 508 atezolizumab cadena pesada CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG	18
SEQ ID N.º 509 atezolizumab cadena pesada CDR3	RHWPGGFDY	9
SEQ ID N.º 510 atezolizumab cadena ligera CDR1	RASQDVSTAV A	11
SEQ ID N.º 511 atezolizumab cadena ligera CDR2	SASFLYS	7
SEQ ID N.º 512 atezolizumab cadena ligera CDR3	QQYLYHPAT	9

[1334] En una realización, los inhibidores de PD-L1 incluyen los anticuerpos descritos en Publicación de solicitud de EE.UU. de patente n.º US 2014/0341917 A1. En otra realización, también se incluyen anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos para unirse a PD-L1. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105, también conocido como BMS-935559, que se divulga en Patente de EE.UU. n.º US 7.943.743. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona de entre los anticuerpos anti-PD-L1 divulgados en. Patente de EE.UU. n.º US 7.943.743.

[1335] En una realización, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente, tal como INVIVOMAB anti-m-PD-L1 clon 10F.9G2 (Catálogo # BE0101, Bio X Cell, Inc., West Lebanon, NH, USA). En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente, como AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (MIH1). Un experto en la materia conoce varios anticuerpos anti-PD-L1 disponibles en el mercado.

[1336] En una realización, el inhibidor de PD-L2 es un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente, tal como BIOLEGEND 24F.10C12 Mouse IgG2a, isotipo κ (catálogo # 329602 Biolegend, Inc., San Diego, CA), el anticuerpo SIGMA anti-PD-L2 (n.º de catálogo SAB3500395, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), u otros anticuerpos anti-PD-L2 disponibles comercialmente y conocidos por los expertos en la técnica.

2. **Preacondicionamiento opcional de los pacientes por linfodepleción**

[1337] **En** una realización, la invención incluye un método de tratamiento de un cáncer con una población de TIL, en el que un paciente se pretrata con quimioterapia no mieloablativa antes de una infusión de TIL según la presente divulgación. En una realización, la invención incluye una población de TIL para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente que ha sido pretratado con quimioterapia no mieloablativa. En una realización, la población de TILs es para administración por infusión. En una realización, la quimioterapia no mieloablativa es ciclofosfamida 60 mg/kg/d durante 2 días (días 27 y 26 antes de la infusión de TIL) y fludarabina 25 mg/m^2/d durante 5 días (días 27 a 23 antes de la infusión de TIL). En una realización, tras la quimioterapia no mieloablativa y la infusión de TIL (en el día 0) según la presente divulgación, el paciente recibe una infusión intravenosa de IL-2 (aldesleukina, disponible comercialmente como PROLEUKIN) por vía

intravenosa a 720.000 UI/kg cada 8 horas hasta tolerancia fisiológica. En ciertas realizaciones, la población de TILs es para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con IL-2, en el que la IL-2 se administra después de la población de TILs.

[1338] Los hallazgos experimentales indican que la linfodepleción previa a la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de tumor desempeña un papel clave en la mejora de la eficacia del tratamiento al eliminar las células T reguladoras y los elementos competidores del sistema inmunitario ("sumideros de citocinas"). En consecuencia, algunas realizaciones de la invención utilizan una etapa de linfodepleción (a veces también denominado "acondicionamiento inmunosupresor") en el paciente antes de la introducción de los TIL de la invención.

[1339] **En** general, la linfodepleción se consigue mediante la administración de fludarabina o ciclofosfamida (la forma activa se denomina mafosfamida) y sus combinaciones. Tales métodos se describen en 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, and Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-2357.

[1340] En algunas realizaciones, la fludarabina se administra a una concentración de 0,5 µg/mL -10 µg/mL de fludarabina. En algunas realizaciones, la fludarabina se administra a una concentración de 1 µg/mL de fludarabina. En algunas realizaciones, el tratamiento con fludarabina se administra durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o 7 días o más. En algunas realizaciones, la fludarabina se administra a una dosis de 10 mg/kg/día, 15 mg/kg/día, 20 mg/kg/día, 25 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 35 mg/kg/día, 40 mg/kg/día, o 45 mg/kg/día. En algunas realizaciones, el tratamiento con fludarabina se administra durante 2-7 días a 35 mg/kg/día. En algunas realizaciones, el tratamiento con fludarabina se administra durante 4-5 días a 35 mg/kg/día. En algunas realizaciones, el tratamiento con fludarabina se administra durante 4-5 días a 25 mg/kg/día.

[1341] **En** algunas realizaciones, la mafosfamida, la forma activa de la ciclofosfamida, se obtiene a una concentración de 0,5 µg/mL -10 µg/mL mediante la administración de ciclofosfamida. En algunas realizaciones, la mafosfamida, la forma activa de la ciclofosfamida, se obtiene a una concentración de 1 µg/mL mediante la administración de ciclofosfamida. En algunas realizaciones, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o 7 días o más. En algunas realizaciones, la ciclofosfamida se administra a una dosis de 100 mg/m^2/día, 150 mg/m^2/día, 175 mg/m^2/día, 200 mg/m^2/día, 225 mg/m^2/día, 250 mg/m^2/día, 275 mg/m^2/día, o 300 mg/m^2/día. En algunas realizaciones, la ciclofosfamida se administra por vía intravenosa *(* i.v.). En algunas realizaciones, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 2-7 días a 35 mg/kg/día. En algunas realizaciones, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 4-5 días a 250 mg/m^2/día i.v. En algunas realizaciones, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 4 días a 250 mg/m^2/día i.v.

[1342] En algunas realizaciones, la linfodepleción se lleva a cabo administrando la fludarabina y la ciclofosfamida juntas a un paciente. En algunas realizaciones, la fludarabina se administra a 25 mg/m^2/día i.v. y la ciclofosfamida se administra a 250 mg/m^2/día i.v. durante 4 días.

[1343] **En** una realización, la linfodepleción se lleva a cabo mediante la administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguida de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

3. **Regímenes IL-2**

[1344] En una realización, el régimen de IL-2 comprende un régimen de IL-2 de dosis alta, en donde el régimen de IL-2 de dosis alta comprende aldesleucina, o un biosimilar o variante de la misma, administrado por vía intravenosa a partir del día después de administrar una porción terapéuticamente eficaz de la población terapéutica de TIL, en donde la aldesleucina o un biosimilar o variante de la misma se administra en una dosis de 0,037 mg/kg o 0,044 mg/kg UI/kg (masa corporal del paciente) utilizando infusiones intravenosas en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia, durante un máximo de 14 dosis. Tras 9 días de descanso, este esquema puede repetirse para otras 14 dosis, hasta un máximo de 28 dosis en total. En algunas realizaciones, la IL-2 se administra en 1, 2, 3, 4, 5 o 6 dosis. En algunos casos, la IL-2 se administra a una dosis máxima de hasta 6 dosis.

[1345] **En** una realización, el régimen de IL-2 comprende un régimen de IL-2 decrescendo. Los regímenes de IL-2 decrecientes se han descrito en O'Day, et al., J. Clin. Oncol. 1999, 17, 2752-61 y Eton, et al.,. En una realización, un régimen decrescendo de IL-2 comprende 18 ×10^6 UI/m^2 administradas por vía intravenosa durante 6 horas, seguidas de 18 ×10^6 UI/m^2 administradas por vía intravenosa durante 12 horas, seguidas de 18 ×10^6 UI/m^2 administradas por vía intravenosa durante 24 horas, seguidas de 4,5 × 10^6 UI/m^2 administradas por vía intravenosa durante 72 horas. Este ciclo de tratamiento puede repetirse cada 28 días hasta un máximo de cuatro ciclos. En una realización, un régimen decrescendo de IL-2 comprende 18.000.000 UI/m^2 el día 1, 9.000.000 UI/m^2 el día 2, y 4.500.000 UI/m^2 los días 3 y 4.

[1346] **En** una realización, el régimen de IL-2 comprende la administración de IL-2 pegilada cada 1, 2, 4, 6, 7, 14, o 21 días a una dosis de 0,10 mg/día a 50 mg/día.

4. **Métodos adicionales de tratamiento**

[1347] **La** divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de la población TIL terapéutica descrita en cualquiera de los párrafos anteriores.

[1348] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores.

[1349] **La** divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificados de tal manera que antes de administrar la dosis terapéuticamente eficaz de la población TIL terapéutica y la composición TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores, respectivamente, se ha administrado al sujeto un régimen de linfodepleción no mieloablativo.

[1350] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificados de tal manera que el régimen de linfodepleción no mieloablativo comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguida de administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

[1351] **La** divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificados para comprender además la etapa de tratar al sujeto con un régimen de IL-2 de dosis alta que comienza el día después de la administración de las células TIL al sujeto.

[1352] **La** divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificado de tal manera que el régimen de IL-2 de dosis alta comprende 600.000 o 720.000 UI/kg administradas como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

[1353] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificados de tal manera que el cáncer es un tumor sólido.

[1354] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificados de tal manera que el cáncer es melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [HNSCC]), glioblastoma (incluido GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal, o carcinoma de células renales.

[1355] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificados de tal manera que el cáncer es melanoma, HNSCC, cáncer cervical, NSCLC, glioblastoma (incluyendo GBM) y cáncer gastrointestinal.

[1356] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores e modificado de tal manera que el cáncer es melanoma.

[1357] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con el cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificados de tal manera que el cáncer es HNSCC.

[1358] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con el cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificados de tal manera que el cáncer es un cáncer cervical.

[1359] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificados de tal manera que el cáncer es NSCLC.

[1360] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con el cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificado de tal manera que el cáncer es glioblastoma (incluyendo GBM).

[1361] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con el cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificados de tal manera que el cáncer es un cáncer gastrointestinal.

[1362] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificado de tal manera que el cáncer es un cáncer hipermutado.

[1363] La divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores modificado de tal manera que el cáncer es un cáncer pediátrico hipermutado.

[1364] La divulgación también proporciona una población TIL terapéutica descrita en cualquiera de los párrafos anteriores para su uso en un método para tratar a un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de la población TIL terapéutica.

[1365] La divulgación también proporciona una composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores para

su uso en un método para tratar a un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de la composición de TIL.

[1366] La divulgación también proporciona una población TIL terapéutica descrita en cualquiera de los párrafos anteriores anteriores o la composición TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores anteriores modificada de tal manera que antes de administrar al sujeto la dosis terapéuticamente eficaz de la población TIL terapéutica descrita en cualquiera de los párrafos anteriores o la composición TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores, se ha administrado al sujeto un régimen de linfodepleción no mieloablativo.

[1367] La divulgación también proporciona una población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores modificada de tal manera que el régimen de linfodepleción no mieloablativo comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguida de administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

[1368] La divulgación también proporciona una población TIL terapéutica o la composición TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores modificada para comprender además la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 de dosis alta que comienza el día después de la administración de las células TIL al paciente.

[1369] La divulgación también proporciona una población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores modificada de tal manera que el régimen de IL-2 de dosis alta comprende 600.000 o 720.000 UI/kg administradas como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

[1370] La divulgación también proporciona una población TIL terapéutica o la composición TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores modificada de tal manera que el cáncer es un tumor sólido.

[1371] En otra realización, la invención proporciona la población TIL terapéutica o la composición TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores, en la que el cáncer es NSCLC.

[1372] La divulgación también proporciona una población TIL terapéutica o la composición TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores modificada de tal manera que el cáncer es un cáncer hipermutado.

[1373] **La** divulgación también proporciona una población TIL terapéutica o la composición TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores modificada de tal manera que el cáncer es un cáncer pediátrico hipermutado.

[1374] La divulgación también proporciona el uso de la población TIL terapéutica descrita en cualquiera de los párrafos anteriores en un método para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de la población TIL terapéutica.

[1375] La divulgación también proporciona el uso de la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores en un método para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de la composición de TIL.

[1376] La divulgación también proporciona el uso de la población TIL terapéutica descrita en cualquiera de los párrafos precedentes anteriores o la composición TIL descrita en cualquiera de los párrafos precedentes anteriores en un método para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto un régimen de linfodepleción no mieloablativo y luego administrar al sujeto la dosis terapéuticamente eficaz de la población TIL terapéutica descrita en cualquiera de los párrafos precedentes anteriores, o la dosis terapéuticamente eficaz de la composición TIL descrita en cualquiera de los párrafos precedentes anteriores.

EJEMPLOS

[1377] Las formas de realización incluidas en el presente documento se describen ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no debe interpretarse que la divulgación aquí contenida se limita a estos ejemplos, sino que debe interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que se hagan evidentes como resultado de las enseñanzas aquí contenidas.

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS PARA LOS PROCESOS DE PRERREP Y REP

[1378] Este Ejemplo describe el procedimiento para la preparación de medios de cultivo tisular para su uso en protocolos que implican el cultivo de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) derivados de varios tipos de tumores, incluido el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). Este medio puede utilizarse para la preparación de cualquiera de los TIL descritos en la presente solicitud y en los Ejemplos.

Preparación de CM1

[1379] Sacar los siguientes reactivos de la cámara frigorífica y calentarlos en un baño de agua a 37°C: (RPMI1640, suero

AB humano, 200mM L-glutamina). Preparar el medio CM1 de acuerdo con la Tabla 18 siguiente, añadiendo cada uno de los ingredientes en la sección superior de una unidad de filtración de 0,2um adecuada al volumen a filtrar. Conservar a 4°C.

TABLA 40: Preparación de CM1

Ingrediente	Concentración final	Volumen final 500 ml	Volumen final IL
RPMI1640	NA	450 mL	900 mL
Suero AB humano, inactivado por calor 10%	50 mL	100 mL	
200mM L-glutamina	2 mm	5 mL	10 m1
55mM BME	55 µm	0,5 mL	1 mL
50mg/ml de sulfato de gentamicina	50 µg/ml	0,5 mL	1 mL

[1380] El día de uso, precalentar la cantidad necesaria de CM1 en un baño de agua a 37°C y añadir 6000 UI/m1 de IL-2.

[1381] Suplementación adicional - según sea necesario de acuerdo con la Tabla 41.

TABLA 41: Suplemento adicional de CM1, según sea necesario.

Suplemento	Concentración de Stock	Dilución	Concentración final
GlutaMAX™	200mM	1:100	2mM
Penicilina/estreptomicina	10.000 U/ml de penicilina	1:100	100 U/ml de penicilina
	10.000µg/ml de estreptomicina		100 µg/ml de estreptomicina
Anfotericina B	250µg/ml	1:100	2,5µg/ml

Preparación de CM2

[1382] Retire el CM1 preparado del frigorífico o prepare CM1 fresco según la sección 7.3 anterior. Sacar AIM-V® del frigorífico y preparar la cantidad de CM2 necesaria mezclando CM1 preparado con un volumen igual de AIM-V® en un frasco estéril de medios. Se añadieron 3000 UI/ml de IL-2 al medio CM2 el día de su utilización. Hizo suficiente cantidad de CM2 con 3000 IU/ml de IL-2 el día de uso. Etiquete el frasco de medio CM2 con su nombre, las iniciales del preparador, la fecha en que se filtró/preparó, la fecha de caducidad de dos semanas y guárdelo a 4°C hasta que lo necesite para el cultivo de tejidos.

Preparación de CM3

[1383] Preparado CM3 el día que se requería para su uso. El CM3 era el mismo que el medio AIM-V®, suplementado con 3000 UI/ml de IL-2 el día de su utilización. Preparar una cantidad de CM3 suficiente para las necesidades experimentales añadiendo la solución madre de IL-2 directamente a la botella o bolsa de AIM-V. Mezclar bien agitando suavemente. Etiquetar el frasco con "3000 UI/ml IL-2" inmediatamente después de añadirlo al AIM-V. Si sobraba CM3, guárdelo en frascos a 4°C etiquetados con el nombre del medio, las iniciales del preparador, la fecha de preparación del medio y su fecha de caducidad (7 días después de la preparación). Medios desechados suplementados con IL-2 tras 7 días de almacenamiento a 4°C.

Preparación de CM4

[1384] CM4 fue igual que CM3, con el suplemento adicional de 2mM GlutaMAX™ (concentración final). Por cada 1L de CM3, añadir 10m1 de 200mM de G1utaMAX™. Preparar una cantidad de CM4 suficiente para las necesidades experimentales añadiendo solución madre de IL-2 y solución madre de G1utaMAX™ directamente a la botella o bolsa de AIM-V. Mezclar bien agitando suavemente. Etiquetar el frasco con "3000 IL/nil IL-2 y G1utaMAX" inmediatamente después de añadirlo al AIM-V. Si sobraba CM4, guárdelo en frascos a 4°C etiquetados con el nombre del medio, "G1utaMAX", y su fecha de caducidad (7 días después de la preparación). Medios desechados suplementados con IL-2 tras 7 días de almacenamiento a 4°C.

EJEMPLO 2: USO DEL CÓCTEL DE CITOCINAS IL-2, IL-15, E IL-21

[1385] Este ejemplo describe el uso de las citoquinas IL-2, IL-15, e IL-21, que sirven como factores adicionales de crecimiento de células T, en combinación con el proceso de TIL de los Ejemplos A a G.

[1386] Utilizando los procesos aquí descritos, los TIL pueden cultivarse a partir de tumores de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) en presencia de IL-2 en un brazo del experimento y, en lugar de IL-2, una combinación de IL-2, IL-15, e IL-21 en otro brazo al inicio del cultivo. Una vez finalizado el pre-REP, se evaluaron la expansión, el fenotipo, la función (CD107a+ e IFN-γ) y el repertorio TCR Vβ de los cultivos. La IL-15 y la IL-21 se describen en otra parte del presente documento y en Gruijl, et al., IL-21 promueve la expansión de linfocitos CD27+CD28+ infiltrantes de tumores con

alto potencial citotóxico y baja expansión colateral de células T reguladoras, Santegoets, S. J., J Transl Med., 2013, 11:37 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/).

[1387] Los resultados pueden mostrar que se observa una mayor expansión de TIL (>20%), tanto en células $CD4^+$ como $CD8^+$ en las condiciones tratadas con IL-2, IL-15, e IL-21 en relación con las condiciones tratadas únicamente con IL-2. Se observó una inclinación hacia una población predominantemente $CD8^+$ con un repertorio TCR Vβ sesgado en los TIL obtenidos a partir de los cultivos tratados con IL-2, IL-15, e IL-21 en relación con los cultivos tratados únicamente con IL-2. IFN-γ y CD107a se elevaron en los TIL tratados con IL-2, IL-15, e IL-21, en comparación con los TIL tratados únicamente con IL-2.

EJEMPLO 3: CALIFICACIÓN DE LOTES INDIVIDUALES DE CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS IRRADIADAS CON RAYOS GAMMA

[1388] Este Ejemplo describe un novedoso procedimiento abreviado para calificar lotes individuales de células mononucleares periféricas irradiadas con rayos gamma (PBMCs, también conocidas como MNC) para su uso como células alimentadoras alogénicas en los métodos ejemplares aquí descritos.

[1389] Cada lote alimentador de MNC irradiadas se preparó a partir de un donante individual. Cada lote o donante fue examinado individualmente para determinar su capacidad de expandir TIL en el REP en presencia de anticuerpo anti-CD3 purificado (clon OKT3) e interleucina-2 (IL-2). Además, cada lote de células alimentadoras se probó sin la adición de TIL.para verificar que la dosis recibida de radiación gamma era suficiente para hacerlas incompetentes para la replicación.

Fondo

[1390] Las células alimentadoras de MNC irradiadas con rayos gamma y de crecimiento detenido fueron necesarias para el REP de TIL. Los receptores de membrana de las MNC alimentadoras se unen al anticuerpo anti-CD3 (clon OKT3) y se entrecruzan con los TIL en el matraz REP, estimulando la expansión de los TIL. Los lotes alimentadores se prepararon a partir de la leucaféresis de sangre total extraída de donantes individuales. El producto de leucaféresis se sometió a centrifugación sobre Ficoll-Hypaque, se lavó, se irradió y se crioconservó en condiciones GMP.

[1391] Es importante que a los pacientes que recibieron terapia con TIL no se les infundan células alimentadoras viables, ya que esto puede provocar una enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). Por lo tanto, se detiene el crecimiento de las células alimentadoras dosificando las células con irradiación gamma, lo que provoca roturas de ADN de doble cadena y la pérdida de viabilidad celular de las células MNC en el recultivo.

Criterios de evaluación y montaje experimental

[1392] Los lotes alimentadores se evaluaron con arreglo a dos criterios: 1) su capacidad para expandir los TIL en co-cultivo >100 veces y 2) su incompetencia de replicación.

[1393] Los lotes alimentadores se probaron en formato mini-REP utilizando dos líneas primarias de TIL pre-REP cultivadas en frascos de cultivo de tejidos T25 verticales. Los lotes alimentadores se probaron contra dos líneas TIL distintas, ya que cada línea TIL es única en su capacidad de proliferar en respuesta a la activación en uno REP. Como control, un lote de células alimentadoras MNC irradiadas, que históricamente ha demostrado cumplir los criterios anteriores, se utilizó junto con los lotes de prueba.

[1394] Para garantizar que todos los lotes probados en un único experimento reciban pruebas equivalentes, se dispuso de existencias suficientes de las mismas líneas TIL pre-REP para probar todas las condiciones y todos los lotes alimentadores.

[1395] Para cada lote de células alimentadoras ensayado, había un total de seis matraces T25: Pre-REP TIL línea #1 (2 matraces); Pre-REP TIL línea #2 (2 matraces); y Feeder control (2 matraces). Los matraces que contenían las líneas de TIL n.º 1 y n.º 2 evaluaron la capacidad del lote alimentador para expandir los TIL. Los frascos de control de alimentación evaluaron la incompetencia de replicación del lote de alimentación.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL Día -2/3, Descongelación de las líneas TIL

[1396] Medio CM2 preparado. Calentar CM2 en baño de agua a 37°C. Preparar 40 ml de CM2 suplementado con 3000IU/ml de IL-2. Mantener caliente hasta su uso. Se colocaron 20 ml de CM2 precalentado sin IL-2 en cada uno de los dos tubos cónicos de 50 ml etiquetados con los nombres de las líneas TIL utilizadas. Se retiraron las dos líneas de TIL pre-REP designadas del almacenamiento en LN2 y se transfirieron los viales a la sala de cultivo de tejidos. Descongelar los viales colocándolos dentro de una bolsa de almacenamiento con cierre hermético en un baño de agua a 37°C hasta que quede una pequeña cantidad de hielo.

[1397] Utilizando una pipeta de transferencia estéril, transfiera inmediatamente el contenido del vial a los 20 ml de CM2 en el tubo cónico de 50 ml preparado y etiquetado. QS a 40ml usando CM2 sin IL-2 para lavar las células. Centrifugar a

400 × CF durante 5 minutos. Aspirar el sobrenadante y resuspender en 5 ml de CM2 caliente suplementado con 3000 UI/ml de IL-2.

[1398] Se extrajo una pequeña alícuota (20µl) por duplicado para el recuento celular utilizando un contador celular automatizado. Registre los recuentos. Durante el recuento, coloque el tubo cónico de 50 ml con células TIL en una incubadora humidificada a 37 °C y 5% de CO_2, con el tapón aflojado para permitir el intercambio de gases. Se determinó la concentración celular y se diluyeron los TIL a 1 × 10^6 células/ml en CM2 suplementado con IL-2 a 3000 UI/ml.

[1399] Cultivado en 2ml/pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos en tantos pocillos como sea necesario en una incubadora humidificada a 37°C hasta el Día 0 del mini-REP. Cultivamos las diferentes líneas de TIL en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos separadas para evitar confusiones y posibles contaminaciones cruzadas.

Día 0, iniciar Mini-REP

[1400] Prepare suficiente medio CM2 para el número de lotes alimentadores a probar. (Por ejemplo, para probar 4 lotes alimentadores a la vez, prepare 800 ml de medio CM2). Alicuotar una porción del CM2 preparado anteriormente y suplementarlo con 3000 UI/ml de IL-2 para el cultivo de las células. (Por ejemplo, para probar 4 lotes alimentadores a la vez, prepare 500 ml de medio CM2 con 3000 UI/ml de IL-2).

[1401] Trabajando con cada línea TIL por separado para evitar la contaminación cruzada, se retiró la placa de 24 pocillos con cultivo TIL de la incubadora y se transfirió al BSC.

[1402] Utilizando una pipeta de transferencia estéril o una pipeta de 100-1000 µl y punta, extraiga aproximadamente 1 ml de medio de cada pocillo de TIL a utilizar y colóquelo en un pocillo no utilizado de la placa de cultivo de tejido de 24 pocillos.

[1403] Utilizando una pipeta de transferencia estéril nueva o un pipeteador y una punta de 100-1000µl, se mezcló el medio restante con el TIL en los pocillos para resuspender las células y luego se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico de 50 ml etiquetado con el nombre del TIL y se registró el volumen.

[1404] Se lavan los pocillos con el medio reservado y se transfiere ese volumen al mismo tubo cónico de 50 ml. Se centrifugaron las células a 400 × CF para recoger el sedimento celular. Aspirar el sobrenadante del medio y resuspender el sedimento celular en 2-5 ml de medio CM2 que contenga 3000 UI/ml de IL-2, volumen que se utilizará en función del número de pocillos recolecciónds y del tamaño del sedimento - el volumen debe ser suficiente para garantizar una concentración de >1,3 ×10^6 células/ml.

[1405] Utilizando una pipeta serológica, se mezcla bien la suspensión celular y se registra el volumen. Se extrajeron 200µl para un recuento celular utilizando un contador celular automatizado. Durante el recuento, coloque el tubo cónico de 50 ml con células TIL en una incubadora humidificada, con 5% de CO_2 y 37°C, con el tapón aflojado para permitir el intercambio de gases. Registró los recuentos.

[1406] Se retiró de la incubadora el tubo cónico de 50 ml que contenía las células TIL y se resuspendieron las células a una concentración de 1,3 × 10^6 células/ml en CM2 caliente suplementado con 3000IU/ml de IL-2. Devuelve el tubo cónico de 50 ml a la incubadora con el tapón aflojado.

[1407] Se repiten las etapas anteriores para la segunda línea TIL.

[1408] Justo antes de colocar los TIL en los matraces T25 para el experimento, los TIL se diluyeron 1:10 para una concentración final de 1,3 × 10^5 células/ml según se indica a continuación.

Preparar la solución de trabajo MACS GMP CD3 pura (OKT3)

[1409] Se extrajo la solución madre de OKT3 (1mg/ml) del refrigerador a 4°C y se colocó en BSC. Se utilizó una concentración final de 30ng/ml de OKT3 en el medio del mini-REP.

[1410] Se necesitaron 600ng de OKT3 para 20ml en cada matraz T25 del experimento; esto equivalía a 60µl de una solución de 10µg/ml para cada 20ml, o 360µl para los 6 matraces probados para cada lote alimentador.

[1411] Por cada lote alimentador probado, hacer 400µl de una dilución 1:100 de 1mg/ml OKT3 para una concentración de trabajo de 10µg/ml (por ejemplo, para probar 4 lotes alimentadores a la vez, hacer 1600µl de una dilución 1:100 de 1mg/ml OKT3: 16µl de 1mg/ml de OKT3 + 1,584ml de medio CM2 con 3000IU/ml de IL-2).

Preparar matraces T25

[1412] Etiquetamos cada matraz y lo llenamos con el medio CM2 antes de preparar las células alimentadoras. Colocar los matraces en la incubadora a 37°C humidificados al 5% de CO_2 para mantener los medios calientes a la espera de añadir

los componentes restantes. Una vez preparadas las células alimentadoras, se añadirán los componentes al CM2 en cada matraz.

TABLA 42: Soluciones

Componente	Volumen en matraces de co-cultivo	Volumen en matraces de control (sólo alimentador)
CM2 + 3000 UI/ml IL-2	18ml	19ml
MNC: 1,3 × 10^7/ml en CM2 + 3000IU IL-2 (concentración final 1,3 × 10^7/flask)	1ml	1ml
OKT3: 10µg/ml en CM2 + 3000IU IL-2	60µl	60µl
TIL: 1,3 × 10^5/ml en CM2 con 3000IU de IL-2 (concentración final 1,3 × 10^6/flask)	1ml	0

Preparar las celúlas alimentadoras

[1413] Se necesitó un mínimo de 78 ×10^6 células alimentadoras por lote probado para este protocolo. Cada vial de 1 ml congelado por SDBB tenía 100 ×10^6 células viables tras la congelación. Suponiendo una recuperación del 50% tras la descongelación del almacenamiento en LN2, se recomendó descongelar al menos dos viales de 1 ml de células alimentadoras por lote, lo que da una estimación de 100 ×10^6 células viables para cada REP. Alternativamente, si se suministraban en viales de 1,8 ml, un solo vial proporcionaba suficientes células alimentadoras.

[1414] Antes de descongelar las células alimentadoras, precalentar aproximadamente 50 ml de CM2 sin IL-2 por cada lote de alimentadoras que se vaya a analizar. Retire los viales del lote de alimentación designados del almacenamiento en LN2, colóquelos en una bolsa de almacenamiento con cremallera y póngalos en hielo. Descongelar los viales dentro de una bolsa de almacenamiento cerrada con cremallera sumergiéndolos en un baño de agua a 37°C. Sacar los viales de la bolsa con cremallera, rociar o limpiar con EtOH al 70% y transferir los viales al BSC.

[1415] Utilizando una pipeta de transferencia, transfiera inmediatamente el contenido de los viales alimentadores a 30 ml de CM2 caliente en un tubo cónico de 50 ml. Lavar el vial con un pequeño volumen de CM2 para eliminar cualquier célula residual en el vial. Centrifugar a 400 × CF durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió en 4 ml de CM2 caliente más 3000 UI/ml de IL-2. Se extrajeron 200 µl para el recuento de células utilizando el contador celular automatizado. Registró los recuentos.

[1416] Células resuspendidas a 1,3 ×10^7 células/ml en CM2 caliente más 3000 UI/ml de IL-2. Células TIL diluidas de 1,3 × 10^6 células/ml a 1,3 × 10^5 células/ml.

Establecer la Co-Cultura

[1417] Células TIL diluidas de 1,3 × 10^6 células/ml a 1,3 × 10^5 células/ml. Se añaden 4,5 ml de medio CM2 a un tubo cónico de 15 ml. Se retiraron las células TIL de la incubadora y se resuspendieron bien utilizando una pipeta serológica de 10 ml. Se extrajeron 0,5 ml de células de la suspensión de 1,3 × 10^6 células/ml de TIL y se añadieron a los 4,5 ml de medio en el tubo cónico de 15 ml. Devolución del vial de stock de TIL a la incubadora. Bien mezclado. Se repite para la segunda línea TIL.

[1418] Transferencia de frascos con medios precalentados para un único lote de alimentación de la incubadora al BSC. Mezclar las células alimentadoras pipeteando arriba y abajo varias veces con una punta de pipeta de 1 ml y transferir 1 ml (1,3 ×10^7 células) a cada matraz para ese lote de alimentadoras. Añadir 60µl de OKT3 stock de trabajo (10µg/ml) a cada matraz. Devuelve los dos matraces de control a la incubadora.

[1419] Se transfirió 1 ml (1,3 × 10^5) de cada lote de TIL al matraz T25 con la etiqueta correspondiente. Vuelva a colocar los matraces en la incubadora e incube en posición vertical. No molestó hasta el día 5.

[1420] Repetido para todos los lotes alimentadores probados.

Día 5, Cambio en los medios de comunicación

[1421] Preparar CM2 con 3000 UI/ml de IL-2. Se necesitan 10 ml para cada matraz. Con una pipeta de 10 ml, transfiera 10 ml de CM2 caliente con 3000 UI/ml de IL-2 a cada matraz. Se volvieron a colocar los matraces en la incubadora y se incubaron en posición vertical hasta el Día 7. Repetido para todos los lotes alimentadores analizados.

Día 7, Recolección

[1422] Se retiran los matraces de la incubadora y se transfieren al BSC, teniendo cuidado de no alterar la capa celular del fondo del matraz. Sin perturbar las células que crecen en el fondo de los matraces, se extraen 10 ml de medio de cada matraz de ensayo y 15 ml de medio de cada uno de los matraces de control.

[1423] Utilizando una pipeta serológica de 10 ml, resuspender las células en el medio restante y mezclar bien para deshacer cualquier grumo de células. Tras mezclar bien la suspensión celular mediante pipeteo, se extrajeron 200µl para el recuento celular. Recuento del TIL utilizando el procedimiento operativo estándar adecuado junto con el equipo contador automático de células. Recuentos registrados en el día 7.

[1424] Repetido para todos los lotes alimentadores probados.

[1425] Los matraces de control de alimentación se evaluaron para determinar la incompetencia de replicación y los matraces que contenían TIL se evaluaron para determinar la expansión de pliegues desde el día 0 de acuerdo con la Tabla TT a continuación.

Día 7, continuación de los frascos de control de alimentación hasta el día 14

[1426] Después de completar los recuentos del Día 7 de los frascos de control de alimentación, se agregaron 15 ml de medio CM2 fresco que contenía 3000 UI/ml de IL-2 a cada uno de los frascos de control. Devolvió los matraces de control a la incubadora y los incubó en posición vertical hasta el día 14.

Día 14, No proliferación prolongada de frascos de control de alimentación

[1427] Se retiran los matraces de la incubadora y se transfieren al BSC, teniendo cuidado de no alterar la capa celular del fondo del matraz. Sin perturbar las células que crecen en el fondo de los matraces, se extraen aproximadamente 17 ml de medio de cada matraz de control. Con una pipeta serológica de 5 ml, se resuspendieron las células en el medio restante y se mezclaron bien para deshacer los posibles grumos de células. Registrar los volúmenes de cada matraz.

[1428] Después de mezclar bien la suspensión celular mediante pipeteo, se extrajeron 200µl para el recuento celular. Recuento del TIL utilizando el procedimiento operativo estándar adecuado junto con el equipo contador automático de células. Recuentos registrados.

[1429] Repetido para todos los lotes alimentadores probados.

RESULTADOS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Resultados

[1430] La dosis de irradiación gamma fue suficiente para hacer incompetente la replicación de las células alimentadoras. Se esperaba que todos los lotes cumplieran los criterios de evaluación y también demostraron una reducción del número total viable de células alimentadoras restantes el Día 7 del cultivo REP en comparación con el Día 0.

[1431] Se esperaba que todos los lotes alimentadores cumplieran los criterios de evaluación de expansión 100 veces mayor del crecimiento de TIL para el Día 7 del cultivo REP.

[1432] Se esperaba que los recuentos del día 14 de los frascos de control de alimentación continuaran con la tendencia no proliferativa observada el día 7.

Criterios de aceptación

[1433] Se cumplieron los siguientes criterios de aceptación para cada línea TIL replicada probada para cada lote de células alimentadoras

[1434] La aceptación fue doble, como se indica a continuación (en la Tabla 27).

TABLA 43: Criterios de aceptación

Prueba	Criterios de aceptación
Irradiación de MNC / Incompetencia de replicación	No se observó crecimiento a los 7 y 14 días
Ampliación de TIL	Al menos una expansión 100 veces mayor de cada TIL (mínimo de 1,3 × 10^7 células viables)

[1435] Se evaluó si la dosis de radiación era suficiente para hacer que las células alimentadoras de MNC fueran incompetentes para la replicación cuando se cultivaban en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2. La incompetencia de replicación se evaluó mediante el recuento total de células viables (CTV), determinado por recuento celular automatizado el día 7 y el día 14 del REP.

[1436] El criterio de aceptación fue "Sin Crecimiento", lo que significa que el número total de células viables no ha

aumentado en el Día 7 y en el Día 14 desde el número inicial de células viables puestas en cultivo en el Día 0 del REP.

[1437] Se evaluó la capacidad de las células alimentadoras para soportar la expansión de TIL. El crecimiento de los TIL se midió en términos de expansión de los pliegues de células viables desde el inicio del cultivo en el Día 0 del REP hasta el Día 7 del REP. El día 7, los cultivos de TIL alcanzaron una expansión mínima de 100 veces (es decir, más de 100 veces el número total de células TIL viables puestas en cultivo el día REP 0), según se evaluó mediante recuento celular automatizado.

Pruebas de contingencia de los lotes de alimentación MNC que no cumplen los criterios de aceptación

[1438] En caso de que un lote alimentador de MNC no cumpla con ninguno de los criterios de aceptación descritos anteriormente, se tomarán las siguientes medidas para volver a probar el lote y descartar como causa un simple error del experimentador.

[1439] Si quedan dos o más viales de pruebas satélite del lote, entonces se volvió a analizar el lote. Si quedaba uno o ningún vial de prueba satélite del lote, entonces el lote se consideraba fallido según los criterios de aceptación enumerados anteriormente.

[1440] Para ser calificados, el lote en cuestión y el lote de control debían cumplir los criterios de aceptación arriba indicados. Una vez cumplidos estos criterios, el lote se liberó para su uso.

EJEMPLO 4: CALIFICACIÓN DE LOTES INDIVIDUALES DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA IRRADIADAS CON RAYOS GAMMA

[1441] Este Ejemplo describe un novedoso procedimiento abreviado para calificar lotes individuales de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) irradiadas con rayos gamma para su uso como células alimentadoras alogénicas en los métodos ejemplares aquí descritos. Este ejemplo proporciona un protocolo para la evaluación de lotes de células PBMC irradiadas para su uso en la producción de lotes clínicos de TIL. Cada lote de PBMC irradiadas se preparó a partir de un donante individual. En el transcurso de más de 100 protocolos de cualificación, se demostró que, en todos los casos, los lotes de PBMC irradiadas procedentes del SDBB (Banco de Sangre de San Diego) expanden los TIL >100 veces en el día 7 de uno REP. Este protocolo de cualificación modificado estaba destinado a aplicarse a lotes de PBMC donantes irradiadas procedentes de SDBB, que se sometieron a pruebas adicionales para verificar que la dosis recibida de radiación gamma era suficiente para hacerlas incompetentes para la replicación. Una vez demostrado que mantenían la incompetencia de replicación en el transcurso de 14 días, los lotes de PBMC de donantes se consideraban "cualificados" para su uso en la producción de lotes clínicos de TIL.

Fondo

[1442] Las PBMC irradiadas con rayos gamma y de crecimiento detenido eran necesarias para la actual REP estándar de TIL. Los receptores de membrana de las PBMC se unen al anticuerpo anti-CD3 (clon OKT3) y se entrecruzan con los TIL en cultivo, estimulando la expansión de los TIL. Los lotes de PBMC se prepararon a partir de la leucaféresis de sangre total extraída de donantes individuales. El producto de leucaféresis se sometió a centrifugación sobre Ficoll-Hypaque, se lavó, se irradió y se crioconservó en condiciones GMP.

[1443] Es importante que a los pacientes que recibieron terapia con TIL no se les infundan PBMC viables, ya que esto podría provocar una enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). Por lo tanto, se detiene el crecimiento de las PBMC donantes dosificando las células con irradiación gamma, lo que provoca roturas de ADN de doble cadena y la pérdida de viabilidad celular de las PBMC en el recultivo.

Criterios de evaluación

[1444] 7.2.1 El criterio de evaluación de los lotes de PBMC irradiadas fue su incompetencia de replicación.

Montaje experimental

[1445] Los lotes alimentadores se analizaron en formato mini-REP como si fueran a co-cultivarse con TIL, utilizando frascos de cultivo de tejidos T25 verticales. Lote de control: Un lote de PBMC irradiadas, que históricamente había demostrado cumplir el criterio de 7.2.1, se utilizó junto con los lotes experimentales como control. Para cada lote de PBMC de donante irradiado analizado, se utilizaron frascos duplicados.

Protocolo experimentalDía0

[1446] Se prepararon ~90ml de medio CM2 para cada lote de PBMC de donante a analizar. Se mantuvo caliente el CM2 en un baño de agua a 37 °C. Descongelar una alícuota de 6 $\times 10^6$ UI/ml de IL-2. Devolvió el medio CM2 al BSC, limpiándolo con EtOH al 70% antes de colocarlo en la campana. Para cada lote de PBMC analizado, retire unos 60 ml de CM2 a una botella estéril separada. Añadir IL-2 de la solución madre descongelada de 6 $\times 10^6$ UI/ml a este medio para una

concentración final de 3000 UI/ml. Etiquetar esta botella como "CM2/IL2" (o similar) para distinguirla de CM2 no suplementada.

Preparar OKT3

[1447] Sacar la solución madre de anti-CD3 (OKT3) del refrigerador a 4°C y colocarla en el BSC. Se utilizó una concentración final de 30ng/ml de OKT3 en el medio del mini-REP. Preparar una solución de trabajo de 10µg/ml de anti-CD3 (OKT3) a partir de la solución madre de 1mg/ml. Colocar en el frigorífico hasta que se necesite.

[1448] Para cada lote de PBMC analizado, preparar 150µl de una dilución 1:100 de la cepa anti-CD3 (OKT3). Por ejemplo, para analizar 4 lotes de PBMC a la vez, prepare 600µl de 10µg/ml de anti-CD3 (OKT3) añadiendo 6µl de la solución madre de 1mg/ml a 594µl de CM2 suplementada con 3000 UI/ml de IL-2.

Preparar matraces

[1449] Se añadieron 19 ml por matraz de CM2/IL-2 a los matraces T25 etiquetados y se colocaron los matraces en una incubadora a 37°C, humidificada y con un 5% de CO_2 mientras se preparaban las células.

Preparar PBMC irradiadas

[1450] Recuperar viales de lotes de PBMC a analizar del almacenamiento en LN2. Éstos se colocaron a - 80°C o se mantuvieron en hielo seco antes de descongelarlos. Se colocaron 30 ml de CM2 (sin suplemento de IL-2) en tubos cónicos de 50 ml por cada lote que se descongelaba. Etiquetar cada tubo con los diferentes números de lote de las PBMC a descongelar. Tapar bien los tubos y colocarlos en un baño de agua a 37°C antes de utilizarlos. Según sea necesario, devuelva los tubos cónicos de 50 ml al BSC, limpiándolos con EtOH al 70% antes de colocarlos en la campana.

[1451] Retire un vial de PBMC del almacenamiento en frío y colóquelo en una gradilla de tubos flotantes en un baño de agua a 37°C para descongelar. Dejar descongelar hasta que quede una pequeña cantidad de hielo en el vial. Con una pipeta de transferencia estéril, transfiera inmediatamente el contenido del vial a los 30 ml de CM2 del tubo cónico de 50 ml. Se extrajo aproximadamente 1 ml de medio del tubo para enjuagar el vial; se devolvió el enjuague al tubo cónico de 50 ml. Tapar herméticamente y agitar suavemente para lavar las células.

[1452] Centrifugado a 400 × g durante 5min a temperatura ambiente. Aspirar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 1 ml de CM2/IL-2 caliente utilizando una punta de pipeta de 1000µl. Alternativamente, antes de añadir el medio, resuspender el sedimento celular arrastrando el tubo tapado por una gradilla de tubos vacía. Tras resuspender el sedimento celular, llevar el volumen a 4 ml utilizando medio CM2/IL-2. Volumen grabado.

[1453] Se extrajo una pequeña alícuota (por ejemplo, 100µl) para el recuento celular utilizando un contador celular automatizado. Se realizaron recuentos por duplicado de acuerdo con el procedimiento operativo estándar (SOP) del contador de células automatizado particular. Lo más probable es que fuera necesario realizar una dilución de las PBMC antes de efectuar los recuentos celulares. La dilución inicial recomendada es de 1:10, pero varía en función del tipo de contador celular utilizado. Registró los recuentos.

[1454] Se ajustó la concentración de PBMC a 1,3 $\times 10^7$ células/ml utilizando el medio CM2/IL-2. Mezclar bien agitando suavemente o aspirando suavemente de arriba abajo con una pipeta serológica.

Preparación de los frascos de cultivo

[1455] Devueltos dos frascos T25 etiquetados al BSC desde la incubadora de cultivo de tejidos. Devuelto el vial de 10µg/ml de anti-CD3/OKT3 al BSC. Se añadió 1 ml de la suspensión celular de 1,3 $\times 10^7$ PBMC a cada matraz. Añadir 60µl del anti-CD3/OKT3 10µg/ml a cada matraz. Devolvió los matraces tapados a las incubadoras de cultivo de tejidos durante 14 días de crecimiento sin perturbaciones. Volver a colocar el vial anti-CD3/OKT3 en el frigorífico hasta que se necesite para el siguiente lote. Se repite para cada lote de PBMC que se vaya a evaluar.

Día 14, Medición de la no proliferación de PBMC

[1456] Devueltos los matraces T25 duplicados al BSC. Para cada matraz, utilizando una pipeta serológica nueva de 10 ml, se extrajeron ~17 ml de cada uno de los matraces y, a continuación, se sacó con cuidado el medio restante para medir el volumen que quedaba en los matraces. Volumen grabado.

[1457] Mezclar bien la muestra pipeteando arriba y abajo con la misma pipeta serológica.

[1458] Se extrajo una muestra de 200 µl de cada matraz para el recuento. Recuento de células con un contador celular automatizado. Repetir las etapas 7.4.26 - 7.4.31 para cada lote de PBMC que se evalúe.

RESULTADOS Y CRITERIO DE ACEPTACIÓN Resultados

[1459] Se esperaba que la dosis de irradiación gamma fuera suficiente para hacer incompetente la replicación de las células alimentadoras. Se esperaba que todos los lotes cumplieran el criterio de evaluación, demostrando una reducción del número total viable de células alimentadoras restantes el Día 14 del cultivo REP en comparación con el Día 0.

Criterio de aceptación

[1460] Se cumplió el siguiente criterio de aceptación para cada lote de PBMC de donante irradiado sometido a prueba: "Sin crecimiento" - significaba que el número total de células viables en el Día 14 era inferior al número inicial de células viables puestas en cultivo en el Día 0 del REP.

Pruebas de contingencia de los lotes de PBMC que no cumplan el criterio de aceptación.

[1461] En el caso de que un lote de PBMC de donante irradiado no cumpliera con el criterio de aceptación anterior, se tomaron las siguientes medidas para volver a probar el lote y descartar un simple error del experimentador como causa de su fracaso. Si quedaban dos o más viales satélite del lote, se volvía a analizar el lote. Si queda uno o ningún vial satélite del lote, entonces el lote ha fracasado según el criterio de aceptación anterior.

[1462] Para ser calificado, un lote de PBMC sometido a pruebas de contingencia debe tener tanto el lote de control como ambas réplicas del lote en cuestión que alcancen el criterio de aceptación. Una vez cumplido este criterio, el lote se liberó para su uso.

EJEMPLO 5: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE IL-2 (CELLGENIX)

[1463] Este Ejemplo describe el proceso de disolución de interleucina-2 humana recombinante purificada y liofilizada en muestras madre adecuadas para su uso en otros protocolos de cultivo tisular, incluidos todos los descritos en la presente solicitud y en los Ejemplos, incluidos los que implican el uso de rhIL-2.

Procedimiento

[1464] Solución preparada de ácido acético al 0,2% (HAc). Transferir 29mL de agua estéril a un tubo cónico de 50mL. Añadir lmL de ácido acético 1N al tubo cónico de 50mL. Mezclar bien invirtiendo el tubo 2-3 veces. Esterilizar la solución de HAc por filtración utilizando un filtro Steriflip.

[1465] Prepare 1% HSA en PBS. Se añadieron 4mL de solución madre de HSA al 25% a 96mL de PBS en una unidad de filtro estéril de 150mL. Solución filtrada. Conservado a 4°C. Para cada vial de rhIL-2 preparado, rellene los formularios.

[1466] Se preparó una solución madre de rhIL-2 (concentración final de 6 $\times 10^6$ UI/mL). Cada lote de rhIL-2 era diferente y requería información que se encontraba en el Certificado de Análisis (COA) del fabricante, como por ejemplo: 1) Masa de rhIL-2 por vial (mg), 2) Actividad específica de rhIL-2 (UI/mg) y 3) Volumen de reconstitución de HAc al 0,2% recomendado (mL).

[1467] Se calculó el volumen de HSA al 1% necesario para el lote de rhIL-2 mediante la ecuación siguiente:

$$\left(\frac{Masa\ del\ vial\ (mg)\ x\ Actividad\ biológica\ \left(\frac{IU}{mg}\right)}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - HAc\ vol\ (mL) = 1\%\ HSA\ vol\ (mL)$$

[1468] Por ejemplo, según el lote 10200121 COA de rhIL-2 de CellGenix, la actividad específica para el vial de lmg es de 25×10^6 UI/mg. Recomienda reconstituir la rhIL-2 en 2mL de HAc al 0,2%.

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^6\ \frac{IU}{mg}}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

[1469] Se limpió el tapón de goma del vial de IL-2 con una toallita con alcohol. Utilizando una aguja 16G conectada a una jeringa de 3mL, inyectar el volumen recomendado de HAc al 0,2% en el vial. Tenga cuidado de no desplazar el tapón al retirar la aguja. Invertir el vial 3 veces y agitar hasta que se disuelva todo el polvo. Retire con cuidado el tapón y déjelo sobre una toallita con alcohol. Añadir al vial el volumen calculado de HSA al 1%.

[1470] Almacenamiento de la solución de rhIL-2. Para almacenamiento a corto plazo (<72hrs), conservar el vial a 4°C. Para almacenamiento a largo plazo (>72hrs), alícuota del vial en volúmenes más pequeños y almacenados en crioviales a - 20°C hasta su uso. Evita los ciclos de congelación/descongelación. Caducado 6 meses después de la fecha de elaboración. Las etiquetas de Rh-IL-2 incluían el número de proveedor y de catálogo, el número de lote, la fecha de caducidad, las iniciales del operador, la concentración y el volumen de la alícuota.

EJEMPLO 6: PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

[1471] Este ejemplo describe el método de proceso de criopreservación para TILs preparados con el procedimiento abreviado y cerrado descrito en el Ejemplo G usando el Congelador de Tasa Controlada CryoMed, Modelo 7454 (Thermo Scientific).

[1472] El equipo utilizado fue el siguiente: soporte de aluminio para casetes (compatible con las bolsas de congelación CS750), casetes de crioconservación para bolsas de 750 mL, tanque de nitrógeno líquido de baja presión (22 psi), refrigerador, sensor termopar (tipo cinta para bolsas) y bolsas de congelación CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

[1473] El proceso de congelación prevé una velocidad de 0,5 °C desde la nucleación hasta -20 °C y una velocidad de enfriamiento de 1 °C por minuto hasta -80 °C de temperatura final. Los parámetros del programa son los siguientes: Etapa 1 - esperar a 4 °C; Etapa 2: 1,0 °C/min (temperatura de la muestra) a -4 °C; Etapa 3: 20,0 °C/min (temperatura de la cámara) hasta -45 °C; Etapa 4: 10,0 °C/min (temperatura de la cámara) hasta -10,0 °C; Etapa 5: 0,5 °C/min (temperatura de la cámara) hasta -20 °C; y Etapa 6: 1,0 °C/min (temperatura de la muestra) a -80 °C.

EJEMPLO 7: TRATAMIENTO NSCLC CON ANTICUERPOS ANTI-PD-1

Población de Pacientes

[1474] NSCLC sin tratamiento o posquimioterapia pero sin anti-PD-1/PD-L1 Esquemas de tratamiento: Fragmento tumoral, tratar con hasta 4 dosis de anti-PD-1/PD-L1, tratar a los pacientes refractarios primarios con producto TIL criopreservado y listo para su uso en caso de progresión inmediata. Los pacientes refractarios primarios pueden haber progresado después de 2 dosis.

[1475] Los pacientes con recaída también pueden ser tratados tras la progresión (el momento puede variar de meses a años después).

[1476] IL-2 completa hasta 6 dosis.

[1477] Poblaciones de pacientes a considerar con las mismas permutaciones de fabricación señaladas anteriormente:

NSCLC sin tratamiento o posquimioterapia pero sin anti-PD-1/PD-L1

NSCLC sin tratamiento o postquimioterapia pero sin anti-PD-1/PD-L1 que tienen baja expresión de PD-L1

NSCLC *naive* al tratamiento o postquimioterapia pero *naive* anti-PD-1/PD-L1 que tienen baja expresión de PD-L1 y/o presentan enfermedad voluminosa al inicio (por ejemplo, la enfermedad voluminosa se indica cuando el diámetro máximo del tumor es superior a 7 cm medido en el plano transversal o coronal o se definieron como voluminosos los ganglios linfáticos inflamados con un diámetro en el eje corto de 20 mm o superior en CT; véase, por ejemplo, Samejima, J., Japanese Journal of Clinical Oncology, 45(11): 1050-10541 2015)

EJEMPLO 8: GEN 3 PROCESO EJEMPLAR

[1478] El ejemplo ofrece una comparación entre los procesos Gen 2 y Gen 3. Este ejemplo describe el desarrollo de una sólida plataforma de expansión TIL. Las modificaciones del proceso Gen 2 reducen el riesgo y agilizan el proceso de fabricación al disminuir el número de intervenciones de los operarios, reducir el tiempo total de fabricación, optimizar el uso de reactivos y facilitar un proceso flexible de producción celular semicerrado y semiautomatizado susceptible de fabricación de alto rendimiento a escala comercial.

[1479] Los TIL de proceso Gen 2 y Gen 3 se componen de TIL autólogos derivados de un paciente individual mediante resección quirúrgica de un tumor y luego expandidos ex vivo. La etapa de cebado de la primera expansión del proceso Gen 3 consistió en un cultivo celular en presencia de interleucina-2 (IL-2) y del anticuerpo monoclonal OKT3, dirigido al correceptor de células T CD3 en un andamiaje de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) irradiadas.

[1480] La fabricación de productos Gen 2 TIL consistió en dos fases: 1) pre-Rapid Expansion (Pre-REP) y 2) Rapid Expansion Protocol (REP). Durante la Pre-REP los tumores resecados se cortaron en ≤ 50 fragmentos de 2-3 mm en cada dimensión que se cultivaron con medio de cultivo que contenía suero (medio RPMI 1640 que contenía un 10% de

HuSAB suplementado) y 6.000 UI/mL de Interleucina-2 (IL-2) durante un periodo de 11 días. El día 11 se recolecciónron los TIL y se introdujeron en la expansión secundaria de REP a gran escala. La REP consiste en la activación de $\leq 200 \times 106$ de las células viables de la pre-REP en un co-cultivo de 5×109 células alimentadoras de PBMC alogénicas irradiadas cargadas con 150ug de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT3) en un volumen de 5L de CM2 suplementado con 3000 UI/mL de rhIL-2 durante 5 días. El día 16 se reduce el volumen del cultivo en un 90% y se divide la fracción celular en múltiples matraces G-REX-500 a $\geq 1 \times 10^9$ linfocitos viables/matraz y se QS a 5L con CM4. Los TIL se incuban 6 días más. La REP se recolecta el día 22, se lava, se formula y se crioconserva antes de enviarla a -150°C al centro clínico para su infusión.

[1481] La fabricación de productos Gen 3 TIL consistió en tres fases: 1) Primer Protocolo de Expansión 2) Protocolo de Segunda Expansión Rápida (también denominado fase de expansión rápida o REP) y 3) Subdivisión del cultivo. Para llevar a cabo la propagación de Priming First Expansion TIL, el tumor resecado se cortó en ≤ 120 fragmentos de 2-3 mm en cada dimensión. En el día 0 de la primera expansión de cebado, se estableció una capa de alimentación de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras de PBMC alogénicas irradiadas cargadas con OKT-3 en una superficie de aproximadamente $100 cm^2$ en cada uno de los 3 vasos de 100 MCS. Los fragmentos tumorales se distribuyeron y cultivaron en los 3 vasos de 100 MCS cada uno con 500 mL de medio de cultivo CM1 que contenía suero y 6.000 UI/mL de interleucina-2 (IL-2) y 15 ug de OKT-3 durante un periodo de 7 días. El día 7, se inició la REP incorporando una capa adicional de células alimentadoras de aproximadamente 5×10^8 células alimentadoras PBMC alogénicas irradiadas cargadas con OKT-3 en la fase de cultivo fragmentada del tumor en cada uno de los 3 vasos de 100 MCS y cultivando con 500 mL de medio de cultivo CM2 y 6.000 UI/mL de IL-2 y 30 ug de OKT-3. La iniciación de la REP se mejoró activando todo el cultivo de cebado de primera expansión en el mismo recipiente utilizando un sistema cerrado de transferencia de fluidos de células alimentadoras cargadas con OKT3 al recipiente de 100MCS. Para el Gen 3, la ampliación o división de TIL implicó etapas del proceso en los que todo el cultivo celular se amplió a un recipiente más grande mediante transferencia de fluidos en sistema cerrado y se transfirió (de un matraz de 100 M a uno de 500 M) y se añadieron 4 L adicionales de medio CM4. Las células REP se recolecciónron el día 16, se lavaron, se formularon y se criopreservaron antes de enviarlas a -150°C al centro clínico para su infusión.

[1482] En general, el proceso Gen 3 es una plataforma de expansión más corta, más escalable y fácilmente modificable que se adaptará a una fabricación robusta y a la comparabilidad de los procesos.

Tabla 44: Comparación del proceso de fabricación del Gen 2 ejemplar y del Gen 3 ejemplar.

Etapa	Proceso (Gen 2)	Proceso (Gen 3)
Pre REP-día 0	Hasta 50 fragmentos/ 1-G-Rex 100MCS - 11 días En 1 L de medio CM1 + IL-2 (6000 IU/mL)	Tumor entero hasta 120 fragmentos divididos uniformemente en hasta 3 matraces. 1 frasco: 1-60 fragmentos 2 frascos: 61-89 fragmentos 3 frascos 90-120 fragmentos 7 días en 500 mL de medio CM1 + IL-2 (6000 IU/mL) $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras/frasco 15 ug OKT-3/frasco
Iniciación REP	Directo a REP- Día 11-<200e^6 TIL (1)G-Rex 500MCS en medio CM2 de 5L IL-2 (3000 IU/mL) 5×10^8 células alimentadoras 150ug OKT-3	Directo a REP- Día 7-todas las células TIL-mismas G-Rex 100MCS Añadir 500 medios CM2 IL-2 (6000 IU/mL) 5×10^8 células alimentadoras/frasco 30ug OKT-3/frasco
Propagación o ampliación de TIL	Reducción de volumen y división de la fracción celular en hasta 5 G-REX 500MCS 4,5 L de medio CM4 + IL-2 (3000 UI/mL) $\geq 1 \times 10^9$ TVC / matraz Split día 16	Cada G-REX 100MCS(1L) se transfiere a 1 G-REX 500MCS Añadir 4L de medio CM4 +IL-2 (3000 UI/mL) Aumentar la escala el día 9 al 11
Recolección	Recolección día 22, lavador automático de células LOVO	Día de la recolección 16 LOVO- lavador automático de células
Formulación final	Producto crioconservado 300IU/ml IL2-CS10 en LN_2, alícuotas múltiples	Producto crioconservado 300IU/ml IL-2-CS10 en LN_2, alícuotas múltiples
Duración del proceso	**22 días**	**16 días**

[1483] En el día 0, para ambos procesos, el tumor se lavó 3 veces y los fragmentos fueron aleatorizados y divididos en dos pools; un pool por proceso. Para el Proceso Gen 2, los fragmentos se transfirieron a un matraz GREX 100MCS con 1 L de medio CM1 que contenía 6.000IU/mL de rhIL-2. Para el proceso Gen 3, los fragmentos se transfirieron a un matraz GREX100MCS con 500 mL de CM1 que contenía 6.000 UI/mL de rhIL-2, 15 ug de OKT-3 y $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras. La siembra de TIL para el día de iniciación de Rep se produjo en días diferentes según cada proceso. Para el Proceso Gen 2, en el que el matraz G-REX 100MCS se redujo en volumen en un 90%, la suspensión celular recogida se transfirió a un nuevo G-REX 500MCS para iniciar la REP el día 11 en medio CM2 que contenía IL-2 (3000 UI/mL), más 5e9 células

alimentadoras y OKT-3 (30 ng/mL). Las células se expandieron y se dividieron el día 16 en múltiples matraces GREX 500 MCS con medio CM4 con IL-2 (3000 UI/mL) según protocolo. A continuación, se cosechó el cultivo y se criopreservó el día 22 según el protocolo. Para el proceso Gen 3, la iniciación REP se produjo el día 7, en el que se utilizó el mismo G-REX 100MCS para la iniciación REP. Brevemente, se añadieron 500 mL de medio CM2 con IL-2 (6000 UI/mL) y 5 $\times 10^8$ células alimentadoras con 30ug de OKT-3 a cada matraz. El día 9-11 se amplió el cultivo. Todo el volumen del G-Rex100M (1L) se transfirió a un G-REX 500MCS y se añadieron 4L de CM4 que contenía IL-2 (3000 UI/mL). Los frascos se incubaron durante 5 días. Los cultivos se recolecciónron y criopreservaron el día 16.

[1484] En la comparación se incluyeron tres tumores diferentes, dos de pulmón (L4054 y L4055) y uno de melanoma (M1085T).

[1485] Los medios CM1 (medio de cultivo 1), CM2 (medio de cultivo 2) y CM4 (medio de cultivo 4) se prepararon con antelación y se mantuvieron a 4°C para L4054 y L4055. Los medios CM1 y CM2 se prepararon sin filtración para comparar el crecimiento celular con y sin filtración de los medios.

[1486] Los medios se calentaron a 37°C con hasta 24 horas de antelación para el tumor L4055 en la iniciación y ampliación de REP.

Resumen de resultados

[1487] Gen 3 se situó dentro del 30% de Gen 2 en cuanto al total de células viables alcanzadas. El producto final Gen 3 mostró una mayor producción de INF-γ tras la reestimulación. El producto final Gen 3 mostró una mayor diversidad clonal medida por el total de secuencias CDR3 únicas presentes. El producto final Gen 3 mostró una mayor longitud media de los telómeros.

Resultados obtenidos

Recuento de células y % de viabilidad:

[1488] La expansión pre REP y REP en los procesos Gen 2 y Gen 3 siguió los detalles descritos anteriormente.

[1489] **Tabla 45: Recuento de células pre-REP.** Para cada tumor, los dos grupos contenían el mismo número de fragmentos. Debido al pequeño tamaño de los tumores, no se alcanzó el número máximo de fragmentos por matraz. Se recolecciónron y contaron las células pre-REP totales (TVC) en el día 11 para el proceso Gen 2 y en el día 7 para el proceso Gen 3. Para comparar los dos brazos pre-REP, el recuento de células se dividió entre el número de fragmentos proporcionados en el cultivo con el fin de calcular una media de células viables por fragmento. Como se indica en la tabla siguiente, el proceso Gen 2 cultivó sistemáticamente más células por fragmento en comparación con el proceso Gen 3. Un cálculo extrapolado del número de TVC esperadas para el proceso Gen 3 en el día 11, que se calculó dividiendo la TVC pre-REP por 7 y luego multiplicada por 11.

Tabla 45: recuentos de células pre-REP

ID del tumor	L4054		L4055*		M1085T	
Proceso	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
pre-REP TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
Número de fragmentos	21	21	24	24	16	16
TVC media por fragmento en pre-REP	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
Valor extrapolado Gen 3 en el día 11 pre REP	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06
* L4055, medio sin filtrar.						

[1490] **Tabla 46: Recuento total de células viables y expansión de pliegues en el producto final TIL:** Para los procesos Gen 2 y Gen 3, se contó las TVC por condición de proceso y se generó el porcentaje de células viables para cada día del proceso. En la recolección, se recogieron células del día 22 (Gen 2) y del día 16 (Gen 3) y se estableció el recuento de TVC. A continuación, se dividió las TVC por el número de fragmentos proporcionados el día 0, para calcular una media de células viables por fragmento. La expansión de pliegues se calculó dividiendo las TVC de recolección por sobre las TVC de inicio de REP. Como se muestra en la tabla, comparando el Gen 2 y el Gen 3, las expansiones de pliegues fueron similares para L4054; en el caso de L4055, la expansión de pliegues fue mayor para el proceso Gen 2. Concretamente, en este caso, los medios se calentaron 24 antes del día de iniciación REP. También se observó una mayor expansión de pliegues en Gen 3 para M1085T. Un cálculo extrapolado del número de TVC esperados para el proceso Gen 3 en el día 22, que se calculó dividiendo la TVC REP por 16 y multiplicándolo por 22.

Tabla 46: Recuento total de células viables y expansión de pliegues en el producto final TIL

ID del tumor	L4054		L4055		M1085T	
Proceso	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
# Fragmentos	21	21	24	24	16	16
TVC /fragmento (en Recolección)	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
Iniciación REP	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
Ampliar	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E-09	3.25E+08
Recolección	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
Pliegue Expansión Recolección/Iniciación REP	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
Valor extrapolado Gen 3 el día 22 de la recolección REP	N/A	2.53E+10	N/A	1.20E+10	N/A	1.06E+10
* L4055, medio sin filtrar.						

[1491] **Tabla 47: % Viabilidad del producto final TIL:** Tras la recolección, los productos REP TIL finales se compararon con los criterios de liberación para el % de viabilidad. Todas las condiciones de los procesos Gen 2 y Gen 3 superaron el criterio de viabilidad del 70% y fueron comparables entre procesos y tumores.

Tabla 47: % de viabilidad de REP

ID del tumor	L4054		L4055		M1085T	
Proceso	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Iniciación REP	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
Ampliar	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
Recolección	87.95%	89.65%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

[1492] **Tabla 48: Estimación del número de células por matraz adicional para el proceso Gen 3.** Debido a que el número de fragmentos por matraz era inferior al número máximo requerido, se calculó un recuento celular estimado en el día de la recolección para cada tumor. La estimación se basó en la expectativa de que los tumores clínicos fueran lo suficientemente grandes como para sembrar 2 o 3 frascos el día 0.

Tabla 49: Cálculo del recuento celular estimado extrapolado a matraces a escala real 2 y 3 en el proceso Gen 3

ID del tumor	L4054		L4055		M1085T	
Proceso Gen 3	2 frascos	3 frascos	2 frascos	3 frascos	2 frascos	3 frascos
Recolección estimada	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

INMUNOFENOTIPADO:

Comparación de marcadores fenotípicos en el producto final TIL:

[1493] Tres tumores L4054, L4055, y M1085T sufrieron expansión de TIL en los procesos Gen 2 y Gen 3. Tras la recolección, los productos finales REP TIL se sometieron a análisis de citometría de flujo para comprobar su pureza, diferenciación y marcadores de memoria. En todas las condiciones, el porcentaje de células TCR a/b+ fue superior al 90%.

[1494] Los TIL recolecciónds del proceso Gen 3 mostraron una mayor expresión de CD8 y CD28 en comparación con los TIL recolecciónds del proceso Gen 2. El proceso Gen 2 mostró un mayor porcentaje de CD4+. **Véase la figura 3 (A, B, C).**

Comparación de marcadores de memoria en el producto final TIL:

[1495] Los TIL recolecciónds del proceso Gen 3 mostraron una mayor expresión en los compartimentos de memoria central en comparación con los TIL del proceso Gen 2. **Véase la figura 4 (A, B, C).**

Comparación de marcadores de activación y agotamiento en el producto final TIL:

[1496] Se analizaron los marcadores de activación y agotamiento en TIL de dos tumores, L4054 y L4055, para comparar el producto final TIL de los procesos de expansión Gen 2 y Gen 3 TIL. Los marcadores de activación y agotamiento fueron comparables entre los procesos Gen 2 y Gen 3. **Véase la figura 5 (A, B) y la figura 6 (A, B).**

SECRECIÓN DE INTERFERÓN GAMMA TRAS LA REESTIMULACIÓN:

[1497] El día de la recolección, el día 22 para el Gen 2 y el día 16 para el Gen 3, los TIL se sometieron a una nueva estimulación durante la noche con placas recubiertas anti -CD3 para L4054 y L4055. La reestimulación en M1085T se

realizó utilizando microesferas anti-CD3, CD28 y CD137. El sobrenadante se recogió tras 24 horas de reestimulación en todas las condiciones y se congeló. El análisis de IFNγ mediante ELISA se evaluó en el sobrenadante de ambos procesos al mismo tiempo utilizando la misma placa ELISA. Se observó una mayor producción de IFNγ del proceso Gen 3 en los tres tumores analizados. **Véase la figura 7 (A, B, C).**

MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE IL-2 EN LOS MEDIOS DE CULTIVO:

[1498] Para comparar el consumo de IL-2 entre los procesos Gen 2 y Gen 3, se recogió sobrenadante celular el día de inicio de REP, de ampliación y de recolección, en los tumores L4054 y L4055. La cantidad de IL-2 en el sobrenadante del cultivo celular se midió mediante el kit Quantitate ELISA de I+D. La tendencia general indica que la concentración de IL-2 sigue siendo superior en el proceso Gen 3 en comparación con el proceso Gen 2. Esto se debe probablemente a la mayor concentración de IL-2 al inicio de la REP (6000 UI/mL) para el Gen 3 junto con el arrastre de los medios durante todo el proceso. **Véase la figura 8 (A, B).**

ANÁLISIS DE SUSTRATOS METABÓLICOS Y METABOLITOS

[1499] Los niveles de sustratos metabólicos como la D-glucosa y la L-glutamina se midieron como sustitutos del consumo total de medios. Se midieron sus metabolitos recíprocos, como el ácido láctico y el amoníaco. La glucosa es un azúcar simple presente en los medios de comunicación que es utilizado por las mitocondrias para producir energía en forma de ATP. Cuando se oxida la glucosa, se produce ácido láctico (el lactato es un éster del ácido láctico). El lactato se produce en gran medida durante la fase de crecimiento exponencial de las células. Los altos niveles de lactato tienen un impacto negativo en los procesos de cultivo celular. **Véase la figura 9 (A, B).**

[1500] Los medios usados para L4054 y L4055 se recogieron en los días de inicio de REP, ampliación y recolección tanto para el proceso Gen 2 como Gen 3. La recogida de medios gastados fue para el Gen 2 el día 11, el día 16 y el día 22; para el Gen 3 fue el día 7, el día 11 y el día 16. El sobrenadante se analizó en un bioanalizador CEDEX para determinar las concentraciones de glucosa, ácido láctico, glutamina, glutamax, y amoníaco.

[1501] La L-glutamina es un aminoácido esencial inestable necesario en las formulaciones de los medios de cultivo celular. La glutamina contiene una amina, y este grupo estructural amida puede transportar y suministrar nitrógeno a las células. Cuando la L-glutamina se oxida, la célula produce un subproducto tóxico amoniaco. Para contrarrestar la degradación de la L-glutamina, los medios para los procesos Gen 2 y Gen 3 se complementaron con Glutamax, que es más estable en soluciones acuosas y no se degrada espontáneamente. En las dos líneas tumorales, el brazo Gen 3 mostró una disminución de L-glutamina y Glutamax durante el proceso y un aumento de amoníaco a lo largo de la REP. En el brazo Gen 2 se observó una concentración constante de L-glutamina y Glutamax, y un ligero aumento de la producción de amoníaco. Los procesos Gen 2 y Gen 3 fueron comparables en el día de la recolección para el amoníaco y mostraron una ligera diferencia en la degradación de L-glutamina. **Véase la figura 10 (A, B, C).**

REPETICIONES DE TELÓMEROS POR FLUJO - PECES:

[1502] Se utilizó la tecnología Flow-FISH para medir la longitud media de la repetición de los telómeros en L4054 y L4055 en el proceso Gen 2 y Gen 3. La determinación de la longitud telomérica relativa (RTL) se calculó utilizando el kit Telomere PNA/FITC para análisis por citometría de flujo de DAKO. El Gen 3 mostró una longitud de telómeros comparable a la del Gen 2.

Análisis CD3

[1503] Para determinar la diversidad clonal de los productos celulares generados en cada proceso, el producto final TIL recolecciónd para L4054 y L4055, fue muestreado y ensayado para el análisis de diversidad clonal a través de la secuenciación de la porción CDR3 de los receptores de células T.

[1504] Tabla 50: Comparación de Gen 2 y Gen3 del porcentaje de secuencias CDR3 únicas compartidas en L4054 en el producto celular recolecciónd de TIL. 199 secuencias son compartidas entre el producto final Gen 3 y Gen 2, lo que corresponde al 97,07% del 80% superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 2 compartidas con el producto final Gen 3.

Tabla 50: Comparación de secuencias uCDR3 compartidas entre procesos Gen 2 y Gen 3 en L4054.

# uCDR3 (% de solapamiento)	Todos los uCDR3		Top 80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

[1505] **Tabla 51: Comparación de Gen 2 y Gen3 del porcentaje de secuencias CDR3 únicas compartidas en L4055 en el producto celular recolecciónd de TIL.** 1833 secuencias son compartidas entre el producto final Gen 3 y Gen 2, lo que corresponde al 99,45% del 80% superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 2 compartidas con el producto final Gen 3.

Tabla 51: Comparación de secuencias uCDR3 compartidas entre procesos Gen 2 y Gen 3 en L4055.

#uCDR3 (% de solapamiento)	Todos los uCDR3		Top 80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

[1506] Los medios CM1 y CM2 se prepararon en avanzado sin filtración y se mantuvieron a 4 grados C hasta su uso para el tumor L4055 a utilizar en el proceso Gen 2 y Gen 3.

[1507] Los medios se calentaron a 37 grados C durante 24 horas por adelantado para el tumor L4055 el día de iniciación REP para el proceso Gen 2 y Gen 3.

[1508] No se midió LDH en los sobrenadantes recogidos en los procesos.

[1509] El recuento de células M1085T TIL se realizó con el contador celular K2 cellometer.

[1510] En el tumor M1085T, no se dispuso de muestras como el sobrenadante para el análisis metabólico, el producto TIL para el análisis de marcadores de activación y agotamiento, la longitud de los telómeros y el análisis CD3 - TCR vb.

CONCLUSIONES

[1511] Este ejemplo compara 3 tejidos tumorales de donantes independientes en términos de atributos de calidad funcional, además de la caracterización fenotípica ampliada y el consumo de medios entre los procesos Gen 2 y Gen 3.

[1512] La comparación de la expansión pre-REP y REP de Gen 2 y Gen 3 se evaluó en términos de células viables totales generadas y viabilidad de la población total de células nucleadas. La dosis de células TVC en el día de la recolección no fue comparable entre Gen 2 (22 días) y Gen 3 (16 días). Las dosis de células del Gen 3 fueron inferiores a las del Gen 2, en torno al 40% del total de células viables recogidas en la recolección.

[1513] Se calculó un número de células extrapolado para el proceso Gen 3 suponiendo que la recolección pre-REP se produjo el día 11 en lugar del día 7 y la recolección REP el día 22 en lugar del día 16. En ambos casos se muestra una cifra más cercana en TVC en comparación con el proceso Gen 2, lo que indica que la activación temprana podría permitir un mejor rendimiento general en el crecimiento de TIL. Tabla 4 y 5 fila inferior.

[1514] En el caso del valor extrapolado para matraces extra (2 o 3) en el proceso Gen 3 asumiendo un mayor tamaño de tumor procesado, y alcanzando el número máximo de fragmentos requeridos por proceso según lo descrito. Se observó que se puede alcanzar una dosis similar en TVC en el día 16 de recolección para el proceso Gen 3 en comparación con el proceso Gen 2 en el día 22. Esta observación es importante e indica que una activación temprana del cultivo puede permitir un mejor rendimiento de los TIL en menos tiempo de procesamiento.

[1515] La comparación de la expansión pre-REP y REP de Gen 2 y Gen 3 se evaluó en términos de células viables totales generadas y viabilidad de la población total de células nucleadas. La dosis de células TVC en el día de la recolección no fue comparable entre Gen 2 (22 días) y Gen 3 (16 días). Las dosis de células del Gen 3 fueron inferiores a las del Gen 2, en torno al 40% del total de células viables recogidas en la recolección.

[1516] En cuanto a la caracterización fenotípica, se observó una mayor expresión de CD8+ y CD28+ en tres tumores del proceso Gen 3 en comparación con el proceso Gen 2. Estos datos indican que el proceso Gen 3 ha mejorado los atributos del producto final TIL en comparación con Gen 2.

[1517] El proceso Gen 3 mostró compartimentos de memoria central ligeramente superiores en comparación con el proceso Gen 2.

[1518] Los procesos Gen 2 y Gen 3 mostraron marcadores de activación y agotamiento comparables, a pesar de la menor duración del proceso Gen 3.

[1519] La producción de IFN gamma (IFNγ) fue 3 veces superior en el producto final Gen 3 en comparación con Gen 2 en los tres tumores analizados. Estos datos indican que el proceso Gen 3 generó un producto TIL altamente funcional y más potente en comparación con el proceso Gen 2, posiblemente debido a la mayor expresión de CD8 y CD28 en Gen 3. La caracterización fenotípica sugirió tendencias positivas en el Gen 3 hacia la expresión CD8+, CD28+ en tres tumores en comparación con el proceso Gen 2.

[1520] La longitud de los telómeros en el producto final TIL entre Gen 2 y Gen 3 era comparable.

[1521] Los niveles de glucosa y lactato fueron comparables entre el producto final de Gen 2 y Gen 3, lo que sugiere que los niveles de nutrientes en los medios del proceso Gen 3 no se vieron afectados debido a la no ejecución de la eliminación de reducción de volumen en cada día del proceso y a un menor volumen total de medios en el proceso, en comparación

con Gen 2.

[1522] En general, el proceso Gen 3 mostró una reducción de casi el doble del tiempo de procesamiento en comparación con el proceso Gen 2, lo que supondría una reducción sustancial en el coste de los bienes (COGs) para el producto TIL ampliado por el proceso Gen 3.

[1523] El consumo de IL-2 indica una tendencia general de consumo de IL-2 en el proceso Gen 2, y en el proceso Gen 3 la IL-2 fue mayor debido a la no eliminación de los medios antiguos.

[1524] El proceso Gen 3 mostró una mayor diversidad clonal medida por el análisis de la secuencia CDR3 TCRab.

[1525] La adición de alimentadores y OKT-3 en el día 0 del pre-REP permitió una activación temprana de TIL y, en general, un mejor rendimiento de TIL de crecimiento utilizando el proceso Gen 3.

[1526] La Tabla 52 describe varias realizaciones y resultados del proceso Gen 3 en comparación con el proceso Gen 2 actual:

Tabla 52: Proceso ejemplar Gen 3.

Etapa	Proceso Gen 2	Proceso Gen 3-Optimizado
Pre REP-día 0	≤50 fragmentos 1X G-Rex 100MCS Medio de 1L IL-2 (6000IU/mL) 11 días).	≤240 fragmentos ≤60 fragmentos/frasco ≤4 frascos Medio ≤2L (500mL/frasco) IL-2 (6000IU/mL) $2,5\times10^8$ células alimentadoras/frasco 15ug OKT3/frasco
Iniciación REP	TIL fresco directo a REP Día 11 ≤200e^8 células viables 5×10^9 células alimentadoras G-Rex 500MCS 5L de medio CM2 + IL-2 (3000 IU/mL) 150ug OKT3	TIL fresco directo a REP Día 7 Activar toda la cultura 5×10^8 células alimentadoras 30 ug OKT3/frasco G-Rex 100MCS 500mL medio+IL-2(6000IU/mL)
Subcultura TIL o ampliación	≤5 G-REX 500MCS ≤1×10 células viables/ matraz 5L/frasco Día 16	≤4 G-REX 500MCS Ampliar toda la cultura 4L/frasco Día 10-11
Recolección	Día de la recolección 22, Lavadora automática de células LOVO 2 ciclos de lavado	Día de la recolección 16 Lavadora automática de células LOVO 5 ciclos de lavado
Formulación final	Producto criopreservado 300IU/ml IL2- CS10 en LN_2, alícuotas múltiples	Producto criopreservado 300IU/ml de IL-2-CS10 en LN_2, alícuotas múltiples
Duración del proceso	**22 días**	**16 días**

EJEMPLO 9: UNA REALIZACIÓN EJEMPLAR DE LA SELECCIÓN Y EXPANSIÓN DE PBLS A PARTIR DE PBMCS EN PACIENTES CON CLL.

[1527] Las PBMC se obtienen de los pacientes y se congelan para su uso posterior o se utilizan frescas. Se recoge un volumen suficiente de sangre periférica para obtener al menos 400.000.000 ($400\times10^{6)}$ PBMC como material de partida en el método de la presente invención. El día 0 del método, la IL-2 a 6×10^6 UI/mL se prepara fresca o descongelada, y se almacena a 4°C o en hielo hasta el momento de su uso. Se preparan 200 mL de medio CM2 combinando 100 mL de medio CM1 (que contiene GlutaMAX®) y diluyéndolo después con 100 mL (1:1) con AIM-V para hacer CM2. El CM2 se protege de la luz y se cierra herméticamente cuando no se utiliza.

[1528] Todas las etapas siguientes se realizan en condiciones estériles de cultivo celular. Una alícuota de CM2 se calienta en un tubo cónico de 50mL en un baño de agua a 37°C para su uso en la descongelación y/o lavado de una muestra congelada de PBMC. Si se utiliza una muestra de PBMC congelada, la muestra se retira del congelador y se mantiene en hielo seco hasta que esté lista para descongelarse. Cuando esté listo para descongelar el criovial de PBMC, se colocan 5 mL de medio CM2 en un tubo cónico estéril de 50 mL. El criovial de la muestra de PBMC se coloca en un baño de agua a 37°C hasta que sólo queden unos pocos cristales de hielo. Se añade medio CM2 calentado, gota a gota, al vial de

muestra en una proporción de volumen 1:1 de muestra:medio (aproximadamente 1 mL). Se extrae todo el contenido del criovial y se transfiere al medio CM2 restante en el tubo cónico de 50 mL. Se utilizan 1-2 mL adicionales de medio CM2 para enjuagar el criovial y se extrae todo el contenido del criovial y se transfiere al tubo cónico de 50 mL. A continuación, se ajusta el volumen del tubo cónico con medio CM2 adicional hasta 15 mL y se agita suavemente para enjuagar las células. A continuación, se centrifuga el tubo cónico a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente para recoger el sedimento celular.

[1529] Se retira el sobrenadante del pellet, se tapa el tubo cónico y luego se rompe el pellet celular, por ejemplo, raspando el tubo a lo largo de una superficie rugosa. Se añade aproximadamente 1mL de medio CM2 al sedimento celular y se aspiran el sedimento y el medio arriba y abajo 5-10 veces con una pipeta para romper el sedimento celular. Se añaden otros 3-5 mL de medio CM2 al tubo y se mezclan con una pipeta para suspender las células. En este punto, se registra el volumen de la suspensión celular. Extraer 100 uL de la suspensión celular del tubo para el recuento celular con un contador celular automático, por ejemplo, un Nexcelom Cellometer K2. Determine el número de células vivas en la muestra y regístrelo.

[1530] Reservar un mínimo de 5 $\times 10^6$ células para fenotipado y otros experimentos de caracterización. Centrifugar las células reservadas a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente para recoger el sedimento celular. Resuspender el sedimento celular en medio de congelación (FBS estéril inactivado por calor con un 20% de DMSO). Congelar una o dos alícuotas de las células reservadas en medio de congelación, y congelar lentamente las alícuotas en un congelador de células (Mr. Frosty) en un congelador a -80°C. Trasladar al almacenamiento en nitrógeno líquido después de un mínimo de 24 horas a -80°C.

[1531] Para las siguientes etapas, utilice soluciones preenfriadas, trabaje rápidamente y mantenga las células frías. La siguiente etapa consiste en purificar la fracción de células T de la muestra de PBMC. Para ello se utiliza un kit de aislamiento de células T Pan (Miltenyi, catálogo nº 130-096-535). Prepare las células para la purificación lavándolas con un tampón de lavado filtrado estéril que contenga PBS, 0,5% de BSA y 2mM de EDTA a pH 7,2. La muestra de PBMC se centrifuga a 400 g durante 5 minutos para recoger el sedimento celular. Se aspira el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 40 uL de tampón de lavado por cada 10^7 células. Añadir 10 uL de Pan T Cell Biotin-Antibody Cocktail por cada 10^7 células. Mezclar bien e incubar durante 5 minutos en el frigorífico o en hielo. Añadir 30 uL de tampón de lavado por cada 10^7 células. Añadir 20 uL de Pan T-cell MicroBead Cocktail por cada 10^7 células. Mezclar bien e incubar durante 10 minutos en el frigorífico o en hielo. Preparar una columna LS y separar magnéticamente las células de las microperlas. La columna LS se coloca en el campo magnético QuadroMACS. La columna LS se lava con 3 mL de tampón de lavado frío, y el lavado se recoge y se desecha. La suspensión celular se aplica a la columna y se recoge el flujo (células no marcadas). Este flujo es la fracción enriquecida de células T (PBL). Lavar la columna con 3 mL de tampón de lavado y recoger el flujo en el mismo tubo que el flujo inicial. Tapar el tubo y colocarlo en hielo. Se trata de la fracción de células T, o PBL. Retire la columna LS del campo magnético, lave la columna con 5 mL de tampón de lavado y recoja la fracción de células no T (células marcadas magnéticamente) en otro tubo. Centrifugar ambas fracciones a 400 g durante 5 minutos para recoger los gránulos celulares. Se aspiran los sobrenadantes de ambas muestras, se rompe el precipitado y se resuspenden las células en 1 mL de medio CM2 suplementado con 3000 UI/mL de IL-2 en cada precipitado, y se pipetea arriba y abajo 5-10 veces para romper los precipitados. Añadir 1-2 mL de CM2 a cada muestra, y mezclar bien cada muestra, y guardar en la incubadora de cultivo de tejidos para las siguientes etapas. Extraer una alícuota de 50 uL de cada muestra, contar las células y registrar el recuento y la viabilidad.

[1532] A continuación, las células T (PBL) se cultivan con Dunabeads™ Human T-Expander CD3/CD28. Un vial de Dynabeads se agita en vórtex durante 30 segundos a velocidad media. Se extrae una alícuota necesaria de microesferas del vial de reserva y se introduce en un microtubo estéril de 1,5 ml. Las microesferas se lavan con solución de lavado de microesferas añadiendo 1 mL de lavado de microesferas al microtubo de 1,5 mL que contiene las microesferas. Mezclar suavemente. Coloque el tubo en el imán DynaMag™-2 y déjelo reposar durante 30 minutos mientras las perlas atraen hacia el imán. Aspirar la solución de lavado de las microesferas y retirar el tubo del imán. Se añade a las microesferas 1mL de medio CM2 suplementado con 3000 UI/mL de IL-2. Todo el contenido del microtubo se transfiere a un tubo cónico de 15 o 50 ml. Llevar las microesferas a una concentración final de unas 500.000/mL utilizando medio CM2 con IL-2.

[1533] Las células T (PBLs) y las perlas se cultivan juntas de la siguiente manera. El día 0: En una placa G-Rex de 24 pocillos, en un total de 7mL por pocillo, añadir 500.000 células T, 500.000 CD3/CD28 Dynabeads, y CM2 suplementado con IL-2. La placa G-Rex se coloca en una incubadora humidificada a 37 °C y 5% de CO_2 hasta el siguiente etapa del proceso (el día 4). Las células restantes se congelan en medio de criopreservación CS10 utilizando un congelador de células Mr. Frosty. La fracción de células no T se congela en medio de criopreservación CS10 utilizando un congelador de células Mr. Frosty. El día 4, se cambia el medio. Se retira la mitad del medio (unos 3,5mL) de cada pocillo de la placa G-rex. Se añade un volumen suficiente (unos 3,5 ml) de medio CM4 suplementado con 3000 UI/mL de IL-2 calentado a 37 °C para sustituir el medio extraído de cada pocillo de muestra. La placa G-rex se devuelve a la incubadora.

[1534] El día 7, las células se preparan para la expansión por REP. Se saca la placa G-rex de la incubadora y se retira la mitad del medio de cada pocillo y se desecha. Las células se resuspenden en el medio restante y se transfieren a un tubo cónico de 15 ml. Los pocillos se lavan con 1 mL cada uno de CM4 suplementado con 3000 UI/mL de IL-2 calentado a 37°C y el medio de lavado se transfiere al mismo tubo de 15 mL con las células. Se extrae una muestra representativa de células y se cuenta utilizando un contador celular automatizado. Si hay menos de 1×10^6 células vivas, se repite el proceso

de expansión de Dynabead en el Día 0. El resto de las células se congela para una expansión de reserva o para estudios de fenotipado y otros estudios de caracterización. Si hay 1×10^6 células vivas o más, la expansión REP se establece en réplicas según el protocolo del Día 0. Alternativamente, con suficientes células, la expansión puede realizarse en un matraz de cultivo G-rex 10M utilizando $^{10\text{-}15\times106}$ PBLs por matraz y una proporción 1:1 de Dynabeads:PBLs en un volumen final de 100mL/pocillo de medio CM4 suplementado con 3000 IU/mL IL-2. La placa y/o el matraz se devuelven a la incubadora. El exceso de PBL puede alicuotarse y congelarse lentamente en un congelador de células Mr. Frosty en un congelador a - 80°C, y transferirse al almacenamiento en nitrógeno líquido tras un mínimo de 24 horas a - 80°C. Estos PBL pueden utilizarse como muestras de reserva para la expansión o para el fenotipado u otros estudios de caracterización.

[1535] El día 11, se cambia el medio. Se retira la mitad del medio de cada pocillo de la placa G-rex o del matraz y se sustituye por la misma cantidad de medio CM4 fresco suplementado con 3000 UI/mL de IL-2 a 37°C.

[1536] El día 14, se recolecciónn los PBL. Si se utiliza la placa G-rex, se retira aproximadamente la mitad del medio de cada pocillo de la placa y se desecha. Los PBL y las perlas se suspenden en el medio restante y se transfieren a un tubo cónico estéril de 15 mL (Tubo 1). Los pocillos se lavan con 1-2 mL de medio AIM-V fresco calentado a 37°C, y el lavado se transfiere al Tubo 1. Se tapa el tubo 1 y se coloca en el imán DynaMag™-15 durante 1 minuto para permitir que las microesferas sean atraídas por el imán. La suspensión celular se transfiere a un nuevo tubo de 15 mL (Tubo 2), y las microesferas se lavan con 2 mL de AIM-V fresco a 37°C. Se vuelve a colocar el Tubo 1 en el imán durante 1 minuto más y, a continuación, se transfiere el medio de lavado al Tubo 2. Los pocillos pueden combinarse si se desea, después de la etapa final de lavado. Extraer una muestra representativa de células y contar, registrar el recuento y la viabilidad. Los tubos pueden colocarse en la incubadora mientras se realiza el recuento. Puede añadirse medio AIM-V adicional al Tubo 2 si las células parecen muy densas. Si se utiliza un matraz, el volumen de éste debe reducirse a unos 10 mL. Se mezcla el contenido del matraz y se transfiere a un tubo cónico de 15 mL (Tubo A). El matraz se lava con 2mL del medio AIM-V como se ha descrito anteriormente y el medio de lavado también se transfiere al Tubo A. El Tubo A se tapa y se coloca en el Imán DynaMag™-15 durante 1 minuto para permitir que las perlas sean atraídas hacia el imán. La suspensión celular se transfiere a un nuevo tubo de 15 mL (Tubo B), y las microesferas se lavan con 2 mL de AIM-V fresco a 37°C. Se vuelve a colocar el Tubo A en el imán durante 1 minuto más y, a continuación, se transfiere el medio de lavado al Tubo B. Si se desea, se pueden combinar los pocillos después de la última etapa de lavado. Extraer una muestra representativa de células y contar, registrar el recuento y la viabilidad. Los tubos pueden colocarse en la incubadora mientras se realiza el recuento. Se puede añadir medio AIM-V adicional al Tubo B si las células aparecen muy densas. Las células pueden utilizarse frescas o congeladas en medio de conservación CS10 a las concentraciones deseadas.

EJEMPLO 10: ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE FASE 2 DE LINFOCITOS AUTÓLOGOS INFILTRANTES DE TUMORES EN PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Resumen

[1537] En este ejemplo se describe un estudio de fase 2 prospectivo, abierto, de cohortes múltiples, no aleatorizado y multicéntrico que evalúa la ACT usando TIL en combinación con pembrolizumab o TIL como terapia única, usando TIL preparados como se describe en la presente solicitud así como en este ejemplo.

Objetivos:

Primario:

[1538] Evaluar la eficacia de TIL autólogo en combinación con pembrolizumab en pacientes con MM, HNSCC, o NSCLC o TIL como terapia única en pacientes con NSCLC en recaída o refractario (r/r), que habían progresado previamente en o después del tratamiento con CPIs, según lo determinado por la tasa de respuesta objetiva (ORR), utilizando los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST 1.1), según la evaluación del investigador.

[1539] Caracterizar el perfil de seguridad de TIL en combinación con pembrolizumab en pacientes con MM, HNSCC, y NSCLC o TIL como tratamiento único en pacientes con NSCLC r/r, medido por la incidencia de acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAEs) de grado ≥ 3.

Secundario:

[1540] Evaluar más a fondo la eficacia de TIL autólogo en combinación con pembrolizumab en pacientes con MM, HNSCC, y NSCLC o TIL como terapia única en pacientes con NSCLC r/r utilizando la tasa de respuesta completa (CR), la duración de la respuesta (DOR), la tasa de control de la enfermedad (DCR), la supervivencia libre de progresión (PFS) utilizando RECIST 1.1, según la evaluación del investigador, y la supervivencia global (OS).

Cohortes:

[1541] Cohorte 1A: Terapia TIL en combinación con pembrolizumab en pacientes con estadio IIIC o estadio IV irresecable o MM con ≤ 3 líneas previas de terapia sistémica excluyendo inmunoterapia. Si han sido tratados previamente, los pacientes deben haber tenido una progresión radiográficamente documentada en o después de la terapia más reciente.

[1542] Cohorte 2A: Terapia TIL en combinación con pembrolizumab en pacientes con HNSCC avanzado, recurrente o metastásico (*por ejemplo*, estadios T1N1-N2B, T2-4N0-N2b) con ≤ 3 líneas previas de terapia sistémica, excluida la inmunoterapia. Si han sido tratados previamente, los pacientes deben haber tenido una progresión radiográficamente documentada en o después de la terapia más reciente.

[1543] Cohorte 3A: Tratamiento con TIL en combinación con pembrolizumab en pacientes con NSCLC localmente avanzado o metastásico (estadio III-IV) con ≤3 líneas previas de tratamiento sistémico, excluida la inmunoterapia. Si han sido tratados previamente, los pacientes deben haber tenido una progresión radiográficamente documentada en o después de la terapia más reciente.

[1544] Cohorte 3B: Terapia con TIL como agente único en pacientes con NSCLC en estadio III o estadio IV que hayan recibido previamente terapia sistémica con IPC (*por ejemplo*, anti-PD-1/anti-PD-L1) como parte de ≤ 3 líneas previas de terapia sistémica. Si han sido tratados previamente, los pacientes deben haber tenido una progresión radiográficamente documentada en o después de la terapia más reciente.

[1545] Los pacientes de las cohortes 3A y 3B (NSCLC) con tumores impulsados por oncogenes con terapia dirigida eficaz disponible deben haber recibido al menos una línea de terapia dirigida.

[1546] Todos los pacientes recibieron terapia con TIL criopreservados autólogos (con o sin pembrolizumab, según la asignación a la cohorte), precedida de un régimen de preacondicionamiento con linfodepleción no mieloablativa (NMA-LD) consistente en ciclofosfamida y fludarabina. Tras la infusión de TIL, se administraron hasta 6 dosis IV máximas de interleucina-2 (IL-2).

[1547] Los siguientes periodos generales de estudio tuvieron lugar en las 4 cohortes, a menos que se especifique lo contrario.

[1548] Cribado y resección tumoral: Hasta 4 semanas (28 días) desde la entrada en el estudio; fabricación del Producto TIL: aproximadamente ≤22 días desde la resección del tumor; y periodo de tratamiento, como se comenta más adelante.

[1549] Periodo de tratamiento (Cohortes 1A, 2A, y 3A): hasta 2 años, incluyendo NMA-LD (7 días), infusión de TIL (1 día) seguida de administraciones de IL-2 (1 a 4 días). Los pacientes reciben una única infusión de pembrolizumab tras la finalización de la resección tumoral para la producción de TIL y las exploraciones basales, pero antes del inicio del régimen NMA-LD. La siguiente dosis de pembrolizumab no se administrará antes de la finalización de la IL-2 y continuará Q3W ± 3 días a partir de entonces durante ≤ 2 años (24 meses) o hasta la progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable, lo que ocurra primero. La visita de fin de tratamiento (EOT) tuvo lugar en los 30 días siguientes a la última dosis de pembrolizumab. La visita podría combinarse con la visita de fin de evaluación (EOA) si procede (*por ejemplo*, la interrupción de pembrolizumab se produjo en la progresión de la enfermedad o al inicio de un nuevo tratamiento contra el cáncer).

[1550] Periodo de tratamiento (Cohorte 3B): hasta 12 días, incluyendo NMA-LD (7 días), TIL, infusión (1 día) seguido de administraciones de IL-2 (1 a 4 días). La visita EOT tuvo lugar una vez que el paciente recibió la última dosis de IL-2. La visita EOT se realizó dentro de los 30 días siguientes a la interrupción del tratamiento y puede combinarse con cualquier visita programada que se produzca dentro de este intervalo durante el periodo de evaluación.

[1551] Período de evaluación: comenzó tras la infusión de TIL el Día 0 y finaliza tras la progresión de la enfermedad, con el inicio de un nuevo tratamiento contra el cáncer, la retirada parcial del consentimiento para las evaluaciones del estudio, o 5 años (Mes 60), lo que ocurra primero. La visita de fin de evaluación (EOA) tenía lugar una vez que el paciente alcanzaba la progresión de la enfermedad o iniciaba un nuevo tratamiento contra el cáncer.

[1552] La terapia autóloga TIL con los TIL preparados como se describe en el presente documento comprendió las siguientes etapas:

1. Resección del tumor para proporcionar el tejido autólogo que sirve como fuente del producto celular TIL;

2. Producto TIL producido en una instalación central de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP);

3. Un régimen de preacondicionamiento NMA-LD de 7 días;

4. Cohortes 1A, 2A y 3A: Los pacientes reciben una única infusión de pembrolizumab tras la finalización de la resección de su tumor para la producción de TIL y las exploraciones basales, pero antes del inicio del régimen NMA-LD. La siguiente dosis de pembrolizumab no se administrará antes de la finalización

de la IL-2 y continuará Q3W ± 3 días después.

5. Infusión del producto TIL autólogo (Día 0); y

6. Administraciones IV de IL-2 hasta un máximo de 6 dosis.

[1553] En las cohortes 1A, 2A, y 3A, la siguiente dosis de pembrolizumab no fue antes de la finalización de la IL-2 y continuó Q3W ± 3 días a partir de entonces durante ≤ 2 años (24 meses), o hasta la progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable, lo que ocurriera primero.

[1554] Los organigramas de las cohortes 1A, 2A y 3A se encuentran en la Figura 7. El diagrama de flujo de la cohorte 3B figura en la figura 8. Los pacientes fueron asignados a la cohorte apropiada por indicación tumoral.

[1555] Terapia TIL + Pembrolizumab (Cohortes 1A, 2A, y 3A)

[1556] Se seleccionó a los pacientes y se les programó una intervención quirúrgica para la resección del tumor. A continuación, a los pacientes se les resecaban una o más lesiones tumorales, que se enviaban a una planta de fabricación central para la producción de TIL.

[1557] A continuación, se imitó el régimen NMA-LD, que consistía en 2 días de ciclofosfamida IV (60 mg/kg) con mesna (según la norma de tratamiento del centro o USPI/SmPC) los días -7 y -6, seguidos de 5 días de fludarabina IV (25 mg/m2: Día -5 hasta Día -1).

[1558] Los pacientes de las cohortes 1A, 2A, y 3A recibieron una única infusión de pembrolizumab tras la finalización de la resección tumoral para la producción de TIL y las exploraciones basales y antes del inicio del régimen NMA-LD. Las administraciones de IL-2 a una dosis de 600.000 UI/kg IV comenzaron tan pronto como 3 horas después, pero no más tarde de 24 horas después, de la finalización de la infusión de TIL el Día 0. Se administrarán administraciones adicionales de IL-2 aproximadamente cada 8 a 12 horas hasta un máximo de 6 dosis. La segunda dosis de pembrolizumab no se administró antes de finalizar el tratamiento con IL-2. Los pacientes deben haberse recuperado de todas las toxicidades relacionadas con IL-2 (Grado ≤2), antes de la segunda administración de pembrolizumab. Pembrolizumab continuará Q3W ± 3 días después durante ≤2 años (24 meses) o hasta la progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable, lo que ocurra primero.

Terapia con TIL como agente único (Cohorte 3B)

[1559] Se seleccionó a los pacientes y se les programó una intervención quirúrgica para la resección del tumor. A continuación, a los pacientes se les resecaban una o más lesiones tumorales, que se enviaban a una planta de fabricación central para la producción de TIL.

[1560] A continuación, el régimen NMA-LD consistió en 2 días de ciclofosfamida IV (60 mg/kg) con mesna (según la norma de tratamiento del centro o USPI/SmPC) el Día -7 y el Día -6, seguidos de 5 días de fludarabina IV (25 mg/m2: Día -5 hasta Día -1).

[1561] La infusión del producto TIL autólogo derivado del tumor se produjo no antes de 24 horas después de la última dosis de fludarabina. Las administraciones de IL-2 a una dosis de 600.000 UI/kg IV pueden haber comenzado tan pronto como 3 horas después, pero no más tarde de 24 horas después, de la finalización de la infusión de TIL.

[1562] Se administraron administraciones adicionales de IL-2 aproximadamente cada 8 a 12 horas hasta un máximo de 6 dosis.

Producción y expansión de linfocitos infiltrantes de tumores

[1563] El producto celular autólogo TIL estaba compuesto por linfocitos T citotóxicos viables derivados del tumor/lesión de un paciente, que se fabrican ex vivo en una instalación central GMP. En la Figura 9, por ejemplo, se muestra un diagrama de flujo ilustrativo del proceso de producción de TIL.

[1564] El proceso de fabricación de TIL comenzó en el centro clínico tras la escisión quirúrgica de una lesión o lesiones tumorales metastásicas primarias o secundarias de ≥1,5 cm de diámetro en cada paciente individual. Se pueden extirpar múltiples lesiones tumorales de diversas localizaciones anatómicas para compilar un agregado total de tejido tumoral; sin embargo, el agregado no debe superar los 4,0 cm de diámetro, ni los 10 g de peso, debido a la cantidad limitada de medio de bioconservación presente en la botella de transporte.

[1565] Una vez que la(s) lesión(es) tumoral(es) ha(n) sido colocada(s) en el frasco de transporte para bioconservación, se envía a una temperatura de entre 2°C y 8°C utilizando un servicio de mensajería urgente a una instalación central de fabricación GMP. A su llegada, las muestras tumorales se diseccionaron en fragmentos, que luego se cultivaron en un protocolo de expansión pre-rápida (Pre-REP) con IL-2 recombinante humana durante ~11 días.

[1566] Estas células pre-REP se expandieron posteriormente utilizando un protocolo de expansión rápida (REP) durante 11 días en presencia de IL-2, OKT3 (un anticuerpo monoclonal murino frente a CD3 humano, también conocido como [muromonab-CD3]) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) alogénicas irradiadas como células alimentadoras.

[1567] A continuación, las células expandidas se recolectaron, lavaron, formularon, crioconservaron y enviaron al centro clínico a través de un servicio de mensajería urgente. La forma de dosificación del producto celular TIL era una "suspensión de células vivas" autóloga crioconservada que estaba lista para la infusión en el paciente del que procedían los TIL. Los pacientes debían recibir la dosis completa del producto fabricado y liberado, que contenía entre 1 $\times 10^9$ y 150 $\times 10^9$ células viables según la especificación del producto. La experiencia clínica indicó que se consiguieron respuestas tumorales objetivas en este intervalo de dosis, que también ha demostrado ser seguro (Radvanyi L.G., et al., Clin Cancer Res. 2012;18(24):6758-70). La dosis completa de producto se suministraba en hasta cuatro bolsas de infusión.

Preparación de los pacientes para recibir el producto celular TIL

[1568] El régimen de preacondicionamiento NMA-LD utilizado en este estudio (es decir, 2 días de ciclofosfamida más mesna, seguidos de 5 días de fludarabina) se basó en el método desarrollado y probado por el Instituto Nacional del Cáncer (Rosenberg S.A., et al., Clin Cancer Res. 2011;17(13):4550-7; Radvanyi L.G., et al., Clin Cancer Res. 2012;18(24):6758-70; Dudley M.E., et al., J Clin Oncol. 2008;26(32):5233-9; Pilon-Thomas S, et al., J Immunother. 2012;35(8):615-20; Dudley M.E., et al., J Clin Oncol. 2005;23(10):2346-57; y Dudley M.E., et al., Science. 2002;298(5594):850-4). Tras el régimen de preacondicionamiento de 7 días, se infundió al paciente el producto celular TIL.

[1569] La infusión de TIL fue seguida por la administración de IL-2 IV (600.000 UI/kg) cada 8 a 12 horas, con la primera dosis administrada entre 3 y 24 horas después de la finalización de la infusión de TIL y continuando hasta un máximo de 6 dosis. Según las normas institucionales, las dosis de IL-2 pueden calcularse en función del peso real.

SELECCIÓN DE POBLACIONES DE PACIENTES

Cohorte 1A:

[1570] Los pacientes tenían un diagnóstico confirmado de MM irresecable (estadio IIIC o estadio IV, confirmado histológicamente según el sistema de estadificación del American Joint Committee on Cancer [AJCC]). Se excluyeron los pacientes con melanoma ocular. Los pacientes no deben haber recibido previamente agentes inmuno-oncológicos dirigidos. Si la mutación BRAF es positiva, el paciente puede haber recibido una terapia previa dirigida a BRAF/MEK.

Cohorte 2A:

[1571] Los pacientes tenían un HNSCC avanzado, recidivante y/o metastásico y pueden no haber recibido tratamiento; se requiere un diagnóstico histológico del tumor primario a través del informe patológico. Los pacientes no deben haber recibido regímenes previos de inmunoterapia.

Cohorte 3A:

[1572] Los pacientes tenían un diagnóstico confirmado de NSCLC en estadio III o estadio IV (escamoso, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes). Los pacientes con tumores impulsados por oncogenes con terapia dirigida eficaz disponible habían recibido al menos una línea de terapia dirigida.

Cohorte 3B:

[1573] Los pacientes tenían un diagnóstico confirmado de NSCLC en estadio III o estadio IV (escamoso, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes) y habían recibido previamente terapia sistémica con CPIs (*por ejemplo*, anti-PD-1/anti-PD-L1). Los pacientes con tumores impulsados por oncogenes con terapia dirigida eficaz disponible habían recibido al menos una línea de terapia dirigida.

[1574] Todos los pacientes habían recibido hasta 3 tratamientos anticancerosos sistémicos previos (véanse los criterios de inclusión más abajo), excluida la inmunoterapia para las cohortes 1A, 2A, y 3A. Si habían sido tratados previamente, los pacientes tenían una progresión radiográficamente confirmada en o después de la terapia más reciente.

Criterios de inclusión

[1575] Los pacientes deben cumplir TODOS los siguientes criterios de inclusión para participar en el estudio:

1. Todos los pacientes tenían un diagnóstico histológico o patológico confirmado de neoplasia maligna de sus respectivas histologías:

- o Melanoma no resecable o metastásico (Cohorte 1A)

- o Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello avanzado, recurrente o metastásico (Cohorte 2A)

- o NSCLC en estadio III o estadio IV (escamoso, no escamoso, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes) (cohortes 3A y 3B).

2. Sólo cohortes 1A, 2A, y 3A: Los pacientes no habían recibido inmunoterapia. Si habían sido tratados previamente, los pacientes habían progresado durante o después de la terapia más reciente. Las cohortes 1A, 2A, y 3A pueden haber recibido hasta 3 terapias sistémicas previas contra el cáncer, en concreto:

- o En la Cohorte 1A: Pacientes con melanoma irresecable o metastásico (estadio IIIC o estadio IV); si la mutación BRAF es positiva, los pacientes podrían haber recibido un inhibidor de BRAF.

- ◦ En la cohorte 2A: Pacientes con HNSCC irresecable o metastásico. A los que habían recibido quimio-radioterapia inicial se les permitió

- ◦ En la cohorte 3A: Pacientes con NSCLC en estadio III o estadio IV (escamoso, no escamoso, adenocarcinoma o carcinoma de células grandes) que no han recibido inmunoterapia y que han progresado después de ≤3 líneas de tratamiento sistémico previo en el contexto local avanzado o metastásico. Los pacientes que recibieron terapia sistémica en el contexto adyuvante o neoadyuvante, o como parte de la quimiorradioterapia definitiva, fueron elegibles y se consideró que habían recibido una línea de terapia si la enfermedad había progresado en los 12 meses siguientes a la finalización de la terapia sistémica previa. Los pacientes con impulsores oncogénicos conocidos (*por ejemplo*, EGFR, ALK, ROS) que presentaban mutaciones sensibles a terapias dirigidas debían haber progresado tras al menos 1 línea de terapia dirigida.

3. Sólo cohorte 3B: Pacientes con NSCLC en estadio III o estadio IV (escamoso, no escamoso, adenocarcinoma o carcinoma de células grandes) que hayan recibido previamente terapia sistémica con CPIs (*por ejemplo*, anti-PD-1/anti-PD-L1) como parte de ≤ 3 líneas previas de terapia sistémica.

- ◦ Pacientes con progresión radiográficamente confirmada en o después de la terapia más reciente.

- ◦ Los pacientes que recibieron terapia sistémica en el contexto adyuvante o neoadyuvante, o como parte de la quimiorradioterapia definitiva, fueron elegibles y se consideró que habían recibido 1 línea de terapia si la enfermedad había progresado en los 12 meses siguientes a la finalización de la terapia sistémica previa.

- ◦ Los pacientes con impulsores oncogénicos conocidos *(por ejemplo*, EGFR, ALK, ROS) que presentaban mutaciones sensibles a terapias dirigidas deben haber progresado tras al menos 1 línea de terapia dirigida.

4. Los pacientes tenían al menos 1 lesión resecable (o lesiones agregadas) de un mínimo de 1,5 cm de diámetro tras la resección para la producción del producto en investigación TIL. Se animó a obtener tejido tumoral de lesiones metastásicas múltiples y diversas, siempre que la resección quirúrgica no supusiera riesgos adicionales para el paciente.

- ◦ Si la lesión considerada para resección para generación de TIL está dentro de un campo previamente irradiado, la lesión debe haber demostrado progresión radiográfica antes de la resección.

- ◦ Los pacientes deben tener una muestra histopatológica adecuada para las pruebas requeridas por el protocolo.

5. Los pacientes tenían enfermedad medible remanente según la definición de las directrices RECIST 1.1 estándar y bien conocidas (*véase*, por ejemplo, Eisenhauer, European Journal of Cancer 45:228-247 (2009), también disponible en la World Wide Web en project.eortc.org/recist/wp-content/uploads/sites/4/2015/03/RECISTGuidelines.pdf) tras la resección tumoral para la fabricación de TIL:

- o Las lesiones en zonas previamente irradiadas no se seleccionaron como lesiones diana a

menos que se hubiera demostrado una progresión de la enfermedad en dichas lesiones;

o Las lesiones que se resecaron parcialmente para la generación de TIL que seguían siendo mensurables según RECIST pueden seleccionarse como lesiones no diana, pero no podrían servir como lesión diana para la evaluación de la respuesta.

6. Los pacientes tenían ≥ 18 años en el momento del consentimiento.

7. Los pacientes tenían un estado funcional de 0 o 1 según el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) y una esperanza de vida estimada de ≥3 meses.

8. Las pacientes en edad fértil o con parejas en edad fértil tenían que estar dispuestas a practicar un método anticonceptivo aprobado de alta eficacia durante el tratamiento y continuar durante 12 meses después de recibir toda la terapia relacionada con el protocolo (Nota: Las mujeres en edad fértil debían utilizar métodos anticonceptivos eficaces durante el tratamiento y durante los 12 meses posteriores a la última dosis de IL-2, o 4 meses después de la última dosis de pembrolizumab (lo que ocurriera más tarde). Los varones no podían donar esperma durante el estudio o durante los 12 meses siguientes a la interrupción del tratamiento, lo que ocurriera más tarde.

9. Los pacientes presentaban los siguientes parámetros hematológicos:

o Recuento absoluto de neutrófilos (ANC) ≥1000/mm3;

o Hemoglobina ≥9,0 g/dL;

o Recuento de plaquetas ≥100.000/mm3.

10. Los pacientes tenían una función orgánica adecuada:

o Alanina aminotransferasa sérica (ALT)/transaminasa glutámico-pirúvica sérica (SGPT) y aspartato aminotransferasa (AST)/SGOT ≤3 veces el límite superior de la normalidad (ULN), pacientes con metástasis hepática ≤5 veces ULN.

o Un aclaramiento de creatinina estimado ≥40 mL/min mediante la fórmula de Cockcroft Gault en el momento del cribado.

o Bilirrubina total ≤2 mg/dL.

o Los pacientes con síndrome de Gilbert deben tener una bilirrubina total ≤3 mg/dL.

11. Los pacientes eran seronegativos para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV1 y HIV2). Los pacientes con serología positiva para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), el anticuerpo central de la hepatitis B (anti HBc) o el virus de la hepatitis C (anti-HCV) que indicaban una infección aguda o crónica se inscribieron en función de la carga vírica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la prevalencia local de determinadas exposiciones víricas.

12. Los pacientes tuvieron un periodo de lavado de la(s) terapia(s) anticancerosa(s) previa(s) de una duración mínima, como se detalla a continuación, antes del primer tratamiento del estudio *(es decir*, inicio de NMA-LD o pembrolizumab):

o Terapia dirigida: se permitió la terapia dirigida previa con un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), MEK, BRAF, ALK, ROS1 u otros agentes dirigidos *(p. ej.*, erlotinib, afatinib, dacomitinib, osimertinib, crizotinib, ceritinib, lorlatinib), siempre que el lavado sea de un mínimo de 14 días antes del inicio del tratamiento.

◦ Quimioterapia: se permitió la quimioterapia/quimiorradiación adyuvante, neoadyuvante o definitiva siempre que el lavado sea de un mínimo de 21 días antes del inicio del tratamiento.

◦ Inmunoterapia solo para la cohorte 3B, se permitió una terapia previa dirigida a puntos de control con un anti-PD-1, otros mAbs o vacunas con un periodo de lavado de ≥ 21 días antes del inicio de la NMA-LD.

o Radioterapia paliativa: se permitió la radioterapia externa previa siempre que todas las toxicidades relacionadas con la radiación se resolvieran a grado 1 o al inicio, excluyendo alopecia, cambios en la pigmentación de la piel u otros acontecimientos clínicamente insignificantes, por ejemplo, dermatitis por radiación en áreas pequeñas o urgencia rectal o

urinaria.

◦ La(s) lesión(es) tumoral(es) evaluada(s) como diana de respuesta mediante RECIST 1.1 estaba(n) fuera del portal de radiación; no obstante, si estaba(n) dentro del portal, debía(n) haber demostrado progresión (véase el Criterio de inclusión anterior).

◦ Cirugía/procedimiento preplanificado: se permitió(n) procedimiento(s) quirúrgico(s) previo(s) siempre que se hubiera(n) producido la cicatrización de la herida, se hubieran resuelto todas las complicaciones y hubieran transcurrido al menos 14 días (para procedimientos quirúrgicos mayores) antes de la resección del tumor.

13. Los pacientes se habían recuperado de todos los acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento anticanceroso (TRAE) previos hasta el Grado ≤1 (según los Criterios Terminológicos Comunes para los Acontecimientos Adversos [CTCAE]), excepto de la alopecia o el vitíligo, antes de la asignación a la cohorte.

14. Los pacientes con toxicidad estable de grado ≥2 de un tratamiento previo contra el cáncer se consideraron caso por caso tras consultar con el supervisor médico.

15. Los pacientes de las cohortes 1A, 2A, y 3A con toxicidad irreversible que no se esperaba razonablemente que se viera exacerbada por el tratamiento con pembrolizumab se incluyeron únicamente tras consultar con el Monitor Médico. Solo para los pacientes de la Cohorte 3B, los pacientes con diarrea o colitis documentada de Grado ≥2 o superior como resultado de un tratamiento previo con CPI(s) inhibidor(es) de puntos de control inmunitarios deben haber estado asintomáticos durante al menos 6 meses o haber tenido una colonoscopia normal por evaluación visual postratamiento antes de la resección tumoral.

16. Los pacientes deben haber autorizado por escrito el uso y la divulgación de información sanitaria protegida.

Criterios de exclusión

[1576] Los pacientes que cumplían CUALQUIERA de los siguientes criterios fueron excluidos del estudio:

1. Pacientes con melanoma de origen uveal/ocular

2. Pacientes que habían recibido un aloinjerto de órgano o una terapia de transferencia celular previa que incluía un régimen de quimioterapia no mieloablativo o mieloablativo en los últimos 20 años. (Nota: Este criterio era aplicable a los pacientes sometidos a retratamiento con TIL, con la excepción de que hubieran tenido un régimen NMA-LD previo con su tratamiento previo con TIL).

3. Pacientes con metástasis cerebrales sintomáticas y/o no tratadas.
   1. ◦ - Se tendrá en cuenta para la inscripción a los pacientes con metástasis cerebrales tratadas definitivamente.
   2. previa discusión con el Monitor Médico; si, antes del inicio del tratamiento el paciente es
   3. clínicamente estable durante ≥2 semanas, no hay nuevas lesiones cerebrales mediante resonancia magnética.
   4. imágenes por resonancia magnética (MRI) después del tratamiento, y el paciente no requiere un
   5. tratamiento con corticosteroides continuo.

4. Pacientes en tratamiento con esteroides sistémicos en los 21 días previos a la inscripción.

5. Pacientes embarazadas o en periodo de lactancia.

6. Pacientes con enfermedad(es) médica(s) activa(s) que, en opinión del investigador, suponga(n) un mayor riesgo para la participación en el estudio; como infecciones sistémicas (por ejemplo, sífilis o cualquier otra infección que requiera antibióticos), trastornos de la coagulación u otras enfermedades médicas importantes activas de los sistemas cardiovascular, respiratorio, o inmunitario.

7. Los pacientes no pueden tener trastornos autoinmunes o inflamatorios activos o documentados con anterioridad (incluyendo neumonitis, enfermedad inflamatoria intestinal [por ejemplo, colitis o enfermedad de Crohn], diverticulitis [con excepción de la diverticulosis], lupus eritematoso sistémico, síndrome de sarcoidosis o síndrome de Wegener [granulomatosis con poliangeítis, enfermedad de Graves, artritis reumatoide, hipofisitis, uveítis, etc.]). Las siguientes fueron excepciones a este criterio:

- Pacientes con vitíligo o alopecia.
- Pacientes con hipotiroidismo (por ejemplo, tras el síndrome de Hashimoto) estables en
- Sustitución hormonal.
- Cualquier afección cutánea crónica que no requiriera tratamiento sistémico.
- Pacientes con enfermedad celíaca controlada sólo con dieta.

8. Pacientes que hayan recibido una vacuna viva o atenuada en los 28 días anteriores al inicio del tratamiento.

9. Pacientes que presentaban cualquier forma de inmunodeficiencia primaria (como la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave [SCID] y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida [AIDS]).

10. Pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a cualquier componente de los fármacos del estudio. Los TILs no se administraron a pacientes con hipersensibilidad conocida a cualquier componente de la formulación del producto TIL incluyendo, pero no limitado a, cualquiera de los siguientes:

- - NMA-LD (ciclofosfamida, mesna y fludarabina)
- • Proleukin®, aldesleukin, IL-2
- - Antibióticos del grupo de los aminoglucósidos *(es decir,* estreptomicina, gentamicina [excluidos los que den negativo en la prueba cutánea de hipersensibilidad a la gentamicina]).
- - Cualquier componente de la formulación del producto TIL, incluido el dimetilsulfóxido
- [DMSO], HSA, IL-2 y dextrano-40.
- • Pembrolizumab

11. Pacientes con una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) <45% o que pertenezcan a la clase II o superior de la New York Heart Association. Una prueba de esfuerzo cardiaco que demuestre cualquier anomalía irreversible del movimiento de la pared en cualquier paciente ≥60 años de edad o en pacientes que tengan antecedentes de cardiopatía isquémica, dolor torácico o arritmias auriculares y/o ventriculares clínicamente significativas.

- Los pacientes con una prueba de esfuerzo cardiaco anormal podrían ser inscritos si tuvieran una fracción de eyección adecuada y autorización cardiológica con la aprobación del Monitor Médico del Patrocinador.

12. Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva o restrictiva y con un FEV1 (volumen espiratorio forzado en 1 segundo) documentado ≤60% de la predicción normal.

- - Si un paciente no podía realizar una espirometría fiable debido a una anatomía anómala de las vías respiratorias superiores *(es decir*, traqueostomía), se utilizó una prueba de marcha de 6 minutos para evaluar la función pulmonar. Se excluye a los pacientes que no fueron capaces de caminar una distancia de al menos el 80% de la prevista para su edad y sexo o que muestran signos de hipoxia en cualquier momento de la prueba (SpO2<90%).

13. Pacientes que hayan padecido otra neoplasia maligna primaria en los 3 años anteriores (excepto las que no requirieron tratamiento o habían sido tratadas curativamente hace más de 1 año y, a juicio del investigador, no presentaban un riesgo significativo de recurrencia, incluidos, entre otros, cáncer de piel no melanoma, CDIS, CLIS, cáncer de próstata con puntuación de Gleason ≤6 o cáncer de vejiga).

14. Participación en otro estudio clínico con un producto en investigación en los 21 días siguientes al inicio del tratamiento.

Criterios de valoración del estudio y análisis previstos

[1577] Los criterios de valoración primarios y secundarios se analizaron por separado según la cohorte.

Criterios de Valoración Primarios:

[1578] La ORR se definió como la proporción de pacientes que alcanzaron RP o CR confirmada como mejor respuesta según la evaluación de los investigadores según RECIST 1.1 entre el conjunto de análisis de eficacia.

[1579] La respuesta objetiva se evaluó por cada valoración de la enfermedad y la ORR se expresó como una proporción binomial con el correspondiente IC del 90% de 2 lados. El análisis primario para cada cohorte tuvo lugar cuando todos los pacientes tratados por cohorte tuvieron la oportunidad de ser seguidos durante 12 meses, a menos que progresaran/expiraran o se interrumpiera su tratamiento antes del periodo de evaluación.

[1580] El criterio de valoración primario de seguridad se midió por la tasa de incidencia de cualquier TEAE de grado 3 o superior dentro de cada cohorte expresada como proporciones binomiales con el correspondiente CI del 90% de 2 lados.

Criterios de Evaluación Secundarios:

Eficacia:

Los criterios secundarios de valoración de la eficacia se definieron del siguiente modo:

[1581] La tasa de CR se basa en los respondedores que alcanzaron una CR confirmada evaluada por los investigadores. La DCR se obtuvo como la suma del número de pacientes que alcanzaron una RP/RC confirmada o una DS sostenida (al menos 6 semanas) dividida por el número de pacientes del conjunto de análisis de eficacia × 100%. La tasa de CR y DCR se resumió mediante una estimación puntual y su CI del 90% de dos caras.

[1582] La DOR se definió entre los pacientes que alcanzaron una respuesta objetiva. Se midió desde la primera vez que se cumplieron los criterios de respuesta (PR/CR) hasta la primera fecha en que se documentó objetivamente la enfermedad recurrente o progresiva, o la recepción del tratamiento anticanceroso posterior o el fallecimiento del paciente (lo que se registrara primero). A los pacientes que no experimenten PD o que no hayan fallecido antes del momento del corte de datos o del bloqueo final de la base de datos se les censurarán los tiempos de los eventos en la última fecha en que se realice una evaluación adecuada del estado del tumor.

[1583] PFS se definió como el tiempo (en meses) transcurrido desde el momento de la linfodepleción hasta PD o la muerte por cualquier causa, lo que ocurriera antes. A los pacientes que no experimentaban PD o que no habían expirado en el momento del corte de datos o del bloqueo final de la base de datos se les censuraron los tiempos de los eventos en la última fecha en que se realizó una evaluación adecuada del estado del tumor.

[1584] OS se definió como el tiempo (en meses) transcurrido desde el momento de la linfodepleción hasta la muerte por cualquier causa. A los pacientes que no habían expirado en el momento del corte de datos o del bloqueo final de la base de datos se les censuraron los tiempos de los eventos en la última fecha de su estado de supervivencia conocido.

[1585] La DOR, PFS, y OS se sometieron a censura derecha. Se utilizará el método de Kaplan-Meier para resumir los criterios de valoración de la eficacia en función del tiempo transcurrido hasta el acontecimiento. Los datos de referencia para la evaluación del tumor fueron el último escáner antes de la linfodepleción para todas las cohortes.

[1586] Los parámetros de eficacia anteriores se estimarán para la cohorte aplicable para los subconjuntos definidos por las características basales de la enfermedad; estado de BRAF (sólo cohorte 1A), estado de HPV (sólo cohorte 2A), enfermedad pulmonar escamosa o no escamosa (sólo cohortes 3A y 3B) y estado anti-PD-L1.

EJEMPLO 11: UNA REALIZACIÓN EJEMPLAR DE LA PLATAFORMA DE EXPANSIÓN GEN 3 EN EL DÍA 0

[1587] Preparado medio de lavado tumoral. Medios calentados antes del inicio. Se añaden 5 mL de gentamicina (50mg/mL) a la botella de 500 mL de HBSS. Añadir 5mL de Medio de Lavado de Tumores a un cónico de 15mL que se utilizará para la dilución de OKT3. Conservar a temperatura ambiente (RT)

[1588] Bolsas de células alimentadoras preparadas. Se transfieren estérilmente las células alimentadoras a bolsas de células alimentadoras y se almacenan a 37°C hasta su uso o congelación. Recuento de células alimentadoras si a 37°C. Descongelación y recuento de las células alimentadoras si están congeladas.

[1589] El rango óptimo para la concentración de células alimentadoras está entre 5×10^4 y 5×10^6 células/mL. Preparar cuatro tubos cónicos con 4,5mL de AIM-V. Añadir 0,5 mL de fracción celular para cada recuento celular.

[1590] Si el número total de células alimentadoras viables era $\geq 1 \times 10^9$ células, se procedió al siguiente etapa para ajustar la concentración de células alimentadoras. Calcular el volumen de células alimentadoras que hay que retirar de la primera bolsa de células alimentadoras para añadir 1×10^9 células a una segunda bolsa de células alimentadoras.

[1591] Usando la micropipeta p1000, transfiera 900µl de medio de lavado tumoral a la alícuota OKT3 (100µL). Utilizando una jeringa y una técnica estéril, se extraen 0,6 mL de OKT3 y se añaden a la segunda bolsa de células alimentadoras. Ajuste del volumen del medio a un volumen total de 2L. Transfirió la segunda bolsa de células alimentadoras a la incubadora.

[1592] Detalles de la formulación OKT3: OKT3 puede ser alicuotado y congelado en la concentración original del vial (1mg/mL) en alícuotas de 100ul. ~10X alícuotas por vial de 1mL. Almacenado a -80C. Día 0: 15ug/frasco, es decir, 30ng/mL en 500mL - 60ul máx ~ 1 alícuota.

[1593] Muestras tumorales preparadas. Obtención de placas de 6 pocillos y placas Petri de 100 mm (4 en total). Etiquetar la placa de 6 pocillos "Piezas tumorales sobrantes". Etiquetar una de cada una de las cuatro placas de Petri de 100 mm como "Wash_01°, 'Wash_02', 'Wash_03', 'Wash_04', y 'Holding'.

[1594] Se añadieron 5 mL de Medio de Lavado Tumoral en todos los pocillos de la placa de 6 pocillos etiquetada como Exceso de Piezas Tumorales. Mantuvo el medio de lavado del tumor disponible para su uso posterior para mantener el tumor hidratado durante la disección.

[1595] Se añadieron 50 mL de Medio de Lavado de Tumores a cada placa Petri de 100 mm etiquetadas como Lavado_01, Lavado_02, Lavado_03 y Retención. Con un rotulador, rotula cada placa de Petri como Disección 1 a Disección 4. Incubar el tumor a temperatura ambiente en Wash_01 durante ≥ 3 min. Incubar el tumor a temperatura ambiente en Wash_02 durante ≥ 3 min. Incubar el tumor a temperatura ambiente en Wash_03 durante ≥ 3 min. Después de los lavados se completaron, se trasladó tumor al plato 'Holding' para asegurar que el tejido se mantiene hidratado.

[1596] Mientras se realizaban las incubaciones tumorales, se transfirieron 10 mL de medio de envío tumoral a un tubo etiquetado como Tumor Shipping Medium. Extraer 10mL del medio de envío de tumores en una jeringa e inocular una cada botella de esterilidad anaeróbica y aeróbica con 5 mL de medio de envío de tumores.

[1597] Colocó la regla bajo la tapa de la placa de Petri durante todo el proceso de disección. Medición y registro de la longitud del tumor y del número de fragmentos. Diseccionar el tumor en cuatro piezas intermedias o agrupar en cuatro grupos de volumen equivalente y conservando la estructura tumoral de cada pieza intermedia. Mantenga hidratadas las piezas tumorales.

[1598] Transfirió los trozos de tumor intermedios que no se estaban disecando activamente al plato de sujeción para mantener el tejido hidratado.

[1599] Diseccionó el tumor en fragmentos de 27 mm^3 (3x3x3mm), utilizando como referencia la regla situada bajo la tapa del plato de disección. Se diseccionan los fragmentos intermedios hasta alcanzar los 60 fragmentos. Se contó el número total de fragmentos finales y se prepararon matraces G-Rex 100MCS según el número de fragmentos finales generados (generalmente 60 fragmentos por matraz).

[1600] Retención de fragmentos de tejido favorables en los tubos cónicos etiquetados como Tubo de fragmentos 1 a Tubo de fragmentos 4. Se calculó el número de matraces G-Rex 100MCS para sembrar con suspensión de células alimentadoras en función del número de tubos de fragmentos originados.

[1601] Se retira la bolsa de células alimentadoras de la incubadora y se siembra el G-Rex 100MCS. Etiquetar como D0 (Día 0).

CULTIVO DE ADICIÓN DE FRAGMENTOS TUMORALES EN G-REX100MCS

[1602] En condiciones estériles, desenrosque la tapa del G-Rex 100MCS etiquetado como Tumor Fragments Culture (D0) 1 y el tubo cónico de 50 mL etiquetado como Fragments Tube. Agite el Tubo de Fragmentos 1 abierto y, al mismo tiempo, levante ligeramente la tapa del G-Rex100MCS. Se añade el medio con los fragmentos al G-Rex100MCS mientras se agita. Registro del número de fragmentos transferidos al G-Rex100MCS.

[1603] Una vez localizados los fragmentos en el fondo del matraz GREX, se extrajeron 7 mL de medio y se crearon siete alícuotas de 1 mL - 5 mL para la caracterización ampliada y 2 mL para las muestras de esterilidad. Se almacenaron las 5 alícuotas (sobrenadante final del cultivo de fragmentos) para su caracterización prolongada a -20°C hasta que se necesitaron.

[1604] Inocular una botella de BacT/Alert anaeróbica y una botella de BacT/Alert aeróbica cada una con 1mL de sobrenadante final del cultivo de fragmentos. Repetir para cada matraz muestreado.

EJEMPLO 12: UN EJEMPLO DE PLATAFORMA DE EXPANSIÓN E GEN 3 EN EL DÍA 7-8

[1605] Bolsas de células alimentadoras preparadas. Descongelar las bolsas de alimentación durante 3-5 minutos en un baño de agua a 37°C cuando estén congeladas. Recuento de células alimentadoras si están congeladas.

[1606] El intervalo óptimo para la concentración de células alimentadoras está entre 5×10^4 y 5×10^6 células/mL. Preparar cuatro tubos cónicos con 4,5mL de AIM-V. Añadir 0,5 mL de fracción celular para cada recuento celular en un nuevo tubo criovial. Se mezclaron bien las muestras y se procedió al recuento celular.

[1607] Si el número total de células alimentadoras viables era $\geq 2 \times 10^9$ células, se procedió al siguiente etapa para ajustar la concentración de células alimentadoras. Calcular el volumen de células alimentadoras que hay que retirar de la primera bolsa de células alimentadoras para añadir 2×10^9 células a la segunda bolsa de células alimentadoras.

[1608] Usando la micropipeta p1000, transfieran 900µl de HBSS a una alícuota de 100µl de OKT3. Mezclar pipeteando arriba y abajo 3 veces. Prepara dos alícuotas.

[1609] Detalles de la formulación OKT3: OKT3 puede alicuotarse y congelarse en la concentración original del vial (1 mg/mL) en alícuotas de 100ul. ~10X alícuotas por vial de 1mL. Almacenado a -80C. Día 7/8: 30ug/frasco, *es decir* 60ng/mL en 500mL - 120ul máx ~ 2 alícuotas.

[1610] Usando una jeringa y una técnica estéril, se extrajeron 0.6 mL de OKT3 y se agregaron a la bolsa de células alimentadoras, asegurando que todo se agregara. Ajuste del volumen del medio a un volumen total de 2L. Repetir con la segunda alícuota de OKT3 y añadir a la bolsa de células alimentadoras. Transfirió la segunda bolsa de células alimentadoras a la incubadora.

PREPARAR EL MATRAZ G-REX100MCS CON LA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS ALIMENTADORAS

[1611] Registrado el número de matraces G-Rex 100MCS a procesar según el número de matraces G-Rex generados el Día 0. Se retira el matraz G-Rex de la incubadora y se retira la segunda bolsa de células alimentadoras de la incubadora.

Eliminación del sobrenadante antes de añadir la suspensión de células alimentadoras:

[1612] Se conecta una jeringa de 10 mL al matraz G-Rex100 y se extraen 5 mL de medio. Creó cinco alícuotas de 1 mL - 5 mL para la caracterización extendida y almacenó las 5 alícuotas (sobrenadante final del cultivo de fragmentos) para la caracterización extendida a -20°C hasta que lo solicitara el patrocinador. Etiquetado y repetido para cada matraz G-Rex100.

[1613] 5-20 × 1 mL de muestras para caracterización, dependiendo del número de matraces:

5mL = 1 frasco

10mL = 2 frascos

15 mL = 3 frascos

20 mL =4 frascos

[1614] Se continuó sembrando células alimentadoras en el G-Rex100 MCS y se repitió para cada matraz G-Rex100 MCS. Utilizando métodos de transferencia estériles, se transfirieron por gravedad 500 mL de la segunda bolsa de células alimentadoras por peso (suponiendo que 1g = 1mL) a cada matraz G-Rex 100MCS y se recortó la cantidad. Etiquetado como cultivo de Día 7 y repetido para cada matraz G-Rex100. Transfirió los matraces G-Rex 100MCS a la incubadora.

EJEMPLO 13: UNA REALIZACIÓN EJEMPLAR DE LA PLATAFORMA DE EXPANSIÓN GEN 3 EN EL DÍA 10-11

[1615] Se extrajo el primer matraz G-Rex 100MCS y utilizando condiciones estériles se extrajeron 7 mL de Sobrenadante de Cultivo Preprocesado utilizando una jeringa de 10 mL. Creó siete alícuotas de 1 mL - 5 mL para caracterización ampliada y 2 mL para muestras de esterilidad.

[1616] Mezclar el matraz con cuidado y, utilizando una jeringa nueva de 10 mL, extraer 10 mL de sobrenadante y transferirlos a un tubo de 15 mL etiquetado como D10/11 Mycoplasma Supernatant.

[1617] Se mezcla el matraz con cuidado y, con una nueva jeringa, se extrae el volumen inferior en función del número de matraces que se vayan a procesar:

1 matraz = 40 mL

2 frascos = 20 ml/frasco

3 frascos = 13,3 ml/frasco

4 frascos = 10mL/frasco

[1618] Debe extraerse un total de 40 mL de todos los matraces y juntarse en un tubo cónico de 50 mL etiquetado "Muestra QC Día 10/11" y guardarse en la incubadora hasta que se necesite. Realizado un recuento de células y asignado las células.

[1619] Almacenadas las 5 alícuotas (sobrenadante de cultivo preprocesado) para su caracterización prolongada a ≤-20°C hasta su necesidad. Inocular un frasco de BacT/Alert anaerobio y un frasco de BacT/Alert aerobio cada uno con 1mL de sobrenadante de cultivo preprocesado.

[1620] Se continúa con la suspensión celular transferida al G-Rex 500MCS y se repite para cada G-Rex 100MCS. Utilizando condiciones estériles, transfirió el contenido de cada G-Rex 100MCS a un G-Rex 500MCS, controlando unos 100 mL de transferencia de fluido cada vez. Se detuvo la transferencia cuando el volumen del G-Rex 100MCS se redujo a 500 mL.

[1621] Durante la etapa de transferencia, se utilizó una jeringa de 10 mL y se extrajeron 10 mL de suspensión celular en la jeringa desde el G-Rex 100MCS. Siga las instrucciones según el número de frascos en cultivo. Si sólo 1 frasco: Extrajo 20 mL en total utilizando dos jeringas. Si son 2 matraces: retirar 10 mL por matraz. Si son 3 matraces: retirar 7 mL por matraz. Si son 4 matraces: retirar 5 mL por matraz. Transferir la suspensión celular a un tubo cónico común de 50 mL. Mantener en la incubadora hasta la etapa de recuento celular y la muestra de QC. El número total de células necesarias para el QC fue de ~ 20e6 células: 4 × 0,5 mL de recuentos celulares (los recuentos celulares se realizaron primero sin diluir).

[1622] Células necesarias para los ensayos:

10e6 células como mínimo para el ensayo IFN-G

1e6 células para micoplasma

5e6 células fluyen CD3+/CD45+

Transfirió los matraces G-Rex 500MCS a la incubadora.

Muestras QC preparadas

[1623] Necesitaba al menos 15 $\times 10^8$. Ensayos incluidos: Recuento celular y viabilidad; Mycoplasma (1 $\times 10^6$ células/concentración media viable;) Flow (5 $\times 10^6$ células/concentración media viable;) y ensayo IFN-g **(5 $\times 10^6$ células - 1 $\times 10^6$ células;** se requieren 8-10 $\times 10^6$ células para el ensayo IFN-γ.

[1624] Calculado el volumen de la fracción de células para la crioconservación a 10 $\times 10^6$ células/mL y calculado el número de viales a preparar.

EJEMPLO 14: UNA REALIZACIÓN EJEMPLAR DE LA PLATAFORMA DE EXPANSIÓN GEN 3 DÍA 16-17

Preparación del tampón de lavado (1% HAS PLASMALYTE A)

[1625] Transfirió HAS y PLasmalyte a una bolsa de 5L para hacer tampón de lavado LOVO. Utilizando condiciones estériles, transfiera un volumen total de 125 mL de HSA al 25% a la bolsa de 5L. Conservado a temperatura ambiente.

[1626] Se retiraron y transfirieron 10 mL o 40 mL de tampón de lavado en el tubo "IL-2 6 $\times 10^4$ UI/mL" (10 mL si la IL-2 se preparó con antelación o 40 mL si la IL-2 se preparó fresca).

[1627] Volumen calculado de IL-2 reconstituida para añadir a Plasmalyte+ 1% HSA: volumen de IL-2 reconstituida = (concentración final de IL-2 × volumen final)/ actividad específica de la IL-2 (basada en ensayo estándar). La concentración final de IL-2 fue de 6 $\times 10^4$ UI/mL. El volumen final fue de 40 ml.

[1628] Se elimina el volumen inicial calculado de IL-2 necesario de la IL-2 reconstituida y se transfiere al tubo 'IL-2 6×10^4 UI/mL'. Añadir 100µL de IL-2 6×10^6 UI/mL de la alícuota preparada previamente al tubo etiquetado 'IL-2 6×10^4 UI/mL' que contiene 10mL de tampón de lavado LOVO.

[1629] Se eliminaron unos 4500 mL de sobrenadante de los matraces G-Rex 500MCS. Agitar el sobrenadante restante y transferir las células a la bolsa del Cell Collection Pool. Se repite con todos los matraces G-Rex 500MCS.

[1630] Se retiran 60 mL de sobrenadante y se añaden a tubos de sobrenadante para ensayos de control de calidad, incluida la detección de micoplasma. Almacenado a +2-8°C.

Recogida de células

[1631] Células contadas. Preparar cuatro conicals de 15mL con 4,5mL de AIM-V. Pueden prepararse con antelación. El intervalo óptimo = se sitúa entre 5×10^4 y 5×10^6 células/mL. (se recomienda una dilución de 1:10). Para la dilución 1:10, a 4500µL de AIM V preparado previamente, añadir 500µL de CF. Factor de dilución registrado.

Calculado el TC (total de células) antes de LOVO (vivas + muertas) =

Concentración total media de células

(TC conc. antes de LOVO)

(vivas + muertas)

X

Volumen de la bolsa de origen

Calculado el TVC (total de células viables) antes de LOVO (vivas) =

Concentración total media de células viables

(TVC antes de LOVO)

(vivas)

X

Volumen de la bolsa de origen LOVO

[1632] Cuando el número total de células (CT) era > 5×10^9, extraer 5×10^8 células para criopreservarlas como muestras de retención de MDA. 5×10^8 ÷ concentración media de TC (etapa 14,44) = volumen a eliminar

[1633] Cuando el número total de células (CT) era ≤ 5×10^9, retirar 4×10^6 células para criopreservarlas como muestras de retención de MDA. 4×10^6 ÷ concentración media de CT = volumen a eliminar.

[1634] Utilizó una jeringa del tamaño adecuado para extraer el volumen necesario de la bolsa de origen LOVO. Se mantiene en la incubadora hasta las etapas de criopreservación.

[1635] Cuando se determinó el número total de células, el número de células a eliminar debía permitir la retención de 150×10^9 células viables. Confirmar TVC pre-LOVO 5×10^8 o 4×10^6 o no aplicable. Calculado el volumen de células a eliminar.

[1636] Calculado el total de células que quedan en la bolsa. Calculado el TC (Total de células) pre-LOVO. [Avg. Concentración celular total × Volumen restante = TC pre-LOVO restante].

[1637] Según el Número total de celdas restantes, seleccione el proceso correspondiente en la siguiente tabla:

Células totales:	*Retentado (mL)*
$0 < \text{Células totales} \leq 31\times10^9$	**115**
$31\times10^9 < \text{Células totales} \leq 71\times10^9$	**165**
$71\times10^9 < \text{Células totales} \leq 110\times10^9$	**215**
$110\times10^9 < \text{Total Células} \leq 115\times10^9$	**265**

[1638] Elija el volumen de IL-2 a añadir correspondiente al proceso utilizado. Volumen calculado como: Volumen de retenido × 2 × 300 UI/mL = UI de IL-2 necesarias. UI de IL-2 requerida / 6×10^4 UI/mL = Volumen de IL-2 a añadir Bolsa post LOVO. Registrados todos los volúmenes añadidos. Obtención de muestras en criovial para análisis posteriores.

[1639] Mezclar bien el producto celular. Sellado de todas las bolsas para su posterior procesamiento, incluida la crioconservación cuando proceda.

[1640] Realización de ensayos de Enodxoton, IFN-y, esterilidad y otros según sea necesario en muestras crioviales obtenidas.

EJEMPLO 15: PROCESO GEN 3 EJEMPLAR (TAMBIÉN DENOMINADO GEN 3.1)

PROPÓSITO

[1641] Este ejemplo describe otros estudios relativos a la "Comparabilidad entre los procesos Gen 2 y Gen 3 para la expansión de TIL". El proceso Gen 3 se modificó para incluir una etapa de activación al principio del proceso con el objetivo de aumentar la producción final de células viables totales (TVC) para que fuera comparable (o mejor) a la de Gen 2, manteniendo al mismo tiempo los perfiles fenotípicos y funcionales como se había visto anteriormente.

ALCANCE

[1642] Se evaluó la producción de TVC mediante la introducción de una etapa de activación en los fragmentos tumorales cultivados en el Día 0.

[1643] Demostrada comparabilidad en términos de caracterización funcional y fenotípica ampliada con el estándar Gen 3, así como un brazo de control, a través de dos tumores de pacientes independientes.

[1644] Se analizó el consumo de medios y la producción de metabolitos para confirmar que los parámetros de procesamiento se mantenían en condiciones fisiológicas.

[1645] Todas las ejecuciones de este ejemplo se realizaron en la plataforma a escala real utilizando tejido tumoral de donantes comerciales como material de partida.

INFORMACIÓN

[1646] La realización Gen 3 del proceso se modificó como una realización adicional y se denomina en este ejemplo Gen 3.1.

[1647] El concepto de fabricación Gen 3.1 TIL tiene cuatro intervenciones del operario:

1. Aislamiento y activación de fragmentos tumorales: El día 0 del proceso se disecó el tumor y se generaron los fragmentos finales awe~3×3mm cada uno (hasta 240 fragmentos en total) y se cultivaron en frascos 1-4 G-Rex100MCS. Cada matraz contenía hasta 60 fragmentos, 500 mL de medio CM1 o DM1 y suplementado con 6.000 UI de rhIL-2, 15 µg de OKT3 y $2{,}5\times10^8$ células mononucleares alogénicas irradiadas. El cultivo se incubó a 37°C durante 6-8 días.

2. Reactivación de cultivos TIL: El día 7-8, el cultivo se suplementó mediante la adición lenta de medios CM2 o DM1 suplementados con 6.000 UI de rhIL-2, 30 µg de OKT3 y 5×10^8 células mononucleares alogénicas irradiadas en ambos casos. Se tuvo cuidado de no alterar las células existentes en el fondo del matraz. El cultivo se incubó a 37°C durante 3-4 días.

3. Ampliar la cultura: Ocurre el día 10-11. Durante el escalado del cultivo, todo el contenido del G-Rex100MCS se transfirió a un matraz G-Rex500MCS que contenía 4L de CM4 o DM2 suplementado con 3.000 UI/mL de IL-2 en ambos casos. Los frascos se incubaron a 37°C durante 5-6 días hasta la recolección.

4. Recolección/Lavado/Formulado: El día 16-17 se reduce el volumen de los matraces y se agrupan. Las células se concentraron y se lavaron con PlasmaLyte A pH 7,4 que contenía un 1% de HSA. La suspensión celular lavada se formuló en una proporción 1:1 con CryoStor10 y se complementó con rhIL-2 hasta una concentración final de 300 UI/mL.

[1648] El DP se crioconservó con un congelador de velocidad controlada y se almacenó en nitrógeno líquido en fase vapor. *Los medios estándar completos 1, 2, o 4 de TIL (CM1, CM2, CM4) podían sustituirse por el medio de expansión sin suero de células T CTS™OpTmize™, denominado medio definido (DM1 o DM2), como se ha indicado anteriormente. Para una visión general del proceso, véanse, por ejemplo, las figuras 78 y 79.

Descripción del proceso

[1649] El día 0, el tumor se lavó 3 veces y se fragmentó en fragmentos finales de 3x3x3. Una vez fragmentado todo el tumor, los fragmentos finales se aleatorizaron por igual y se dividieron en tres pools. Se introdujo un conjunto de fragmentos aleatorios en cada brazo, añadiendo el mismo número de fragmentos por las tres matrices experimentales.

[1650] La expansión del tumor L4063 se realizó con medios estándar y la expansión del tumor L4064 se realizó con medios definidos (CTS OpTmizer) para todo el proceso de expansión de TIL. En el presente documento se describen los componentes del medio.

CM1 Medios completos 1: RPMI+ Glutamina suplementado con 2mM Glutamax, 10% Suero AB Humano, Gentamicina (50ug/mL), 2-Mercaptoetanol (55uM). Formulación final del medio suplementada con 6000IU/mL de IL-2

CM2 Medios completos 2: 50% medio CM1 + 50% medio AIM-V. Formulación final del medio suplementada con 6000IU/mL de IL-2

CM4 Medios completos 4: AIM-V suplementado con Glutamax (2mM). Formulación final del medio suplementada con 3000IU/mL de IL-2

CTS OpTmizer CTS™OpTmize™ T-Cell Expansion Basal Medium suplementado con CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (26mL/L).

[1651] DM1: CTS™OpTmize™ T-Cell Expansion Basal Medium suplementado con CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (26mL/L), y CTS™ Immune Cell SR (3%), con Glutamax (2mM). Formulación final suplementada con 6.000 UI/mL de IL-2.

[1652] DM2: CTS™OpTmize™ T-Cell Expansion Basal Medium suplementado con CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (26mL/L), y CTS™ Immune Cell SR (3%), con Glutamax (2mM). Formulación final suplementada con 3.000 UI/mL de IL-2.

[1653] Todos los tipos de medios utilizados, *es decir,* los medios Completos (CM) y Definidos (DM), se prepararon con antelación, se mantuvieron a 4°C hasta el día anterior a su uso y se calentaron a 37°C en una incubadora hasta 24 horas antes del día del proceso.

[1654] La reactivación del cultivo de TIL ocurrió el día 7 para ambos tumores. La ampliación se produjo el día 10 para el L4063 y el día 11 para el L4064. Ambos cultivos se recolecciónron y criopreservaron el día 16.

Resultados esperados

[1655] El Gen 3.1 puede alcanzar un mayor número total de células viables en la recolección del día 16-17 en comparación con el Gen 3.0.

[1656] El Gen 3.1 puede producir niveles similares de IFNγ tras la reestimulación, en relación con el Gen 3.0.

[1657] Gen 3.1 y Gen 3.0 pueden tener una diversidad clonal similar, medida por el total de secuencias CDR3 únicas presentes en el producto final TIL.

Las características fenotípicas en el proceso Gen 3.1 pueden ser similares a las de Gen 3.0.

RESULTADOS OBTENIDOS

[1658] Se contaron las células y se determinó el % de viabilidad de los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1. Expansión en todas las condiciones seguidas detalles descritos en este ejemplo.

Recuento total de células viables y aumento del número de pliegues

[1659] Para cada tumor, los fragmentos se dividieron en tres grupos de igual número. Debido al pequeño tamaño de los tumores, no se alcanzó el número máximo de fragmentos por matraz. Para los tres procesos diferentes, se evaluó el total de células viables y la viabilidad celular para cada condición. Los recuentos celulares se determinaron como TVC el día 7 para la reactivación, TVC el día 10 (L4064) o el día 11 (L4063) para la ampliación, y TVC en la recolección el día 16/17.

[1660] Los recuentos celulares para el Día 7 y el Día 10/11 se tomaron FIO. La expansión de pliegues se calculó dividiendo la TVC del día 16/17 de la recolección por la TVC del día 7 de la reactivación. Para comparar los tres brazos, se dividió la TVC del día de la recolección por el número de fragmentos añadidos en el cultivo el día 0, con el fin de calcular una media de células viables por fragmento.

[1661] Se realizaron recuentos celulares y ensayos de viabilidad para L4063 y L4064. Como se indica en la Figura 89, el proceso Gen 3.1-Test produjo más células por fragmento que el proceso Gen 3.0 en ambos tumores.

Figura 90: Recuento total de células viables y expansión de pliegues

% Viabilidad durante el proceso

[1662] En la reactivación, la ampliación y la recolección, el porcentaje de viabilidad se realizó en todas las condiciones. El día 16/17 de la recolección, se compararon las TVC finales con los criterios de liberación para el % de viabilidad. Todas

las condiciones evaluadas superaron el criterio de viabilidad del 70% y fueron comparables entre procesos y tumores, como se muestra en la Figura 82.

Inmunofenotipado

[1663] Caracterización fenotípica del producto final TIL.

[1664] Los productos finales se sometieron a análisis de citometría de flujo para comprobar su pureza, diferenciación y marcadores de memoria. Los porcentajes de población fueron coherentes para las células TCRα/β, CD4+ y CD8+ en todas las condiciones.

[1665] Se realizó un análisis fenotípico ampliado de REP TIL. El producto TIL mostró un mayor porcentaje de células CD4+ para las condiciones Gen 3.1 en comparación con Gen 3.0 en ambos tumores, y un mayor porcentaje de células CD28+ de la población CD8+ para Gen 3.0 en comparación con Gen 3.1 en ambas condiciones.

[1666] Los TIL recolecciónds de los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1 mostraron marcadores fenotípicos comparables como la expresión de CD27 y CD56 en las células CD4+ y CD8+, y una expresión comparable de CD28 en la población de células CD4+ activadas. La Figura 83 muestra los marcadores fenotípicos del producto final TIL para los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1. Figura 83: Caracterización fenotípica del producto final de TIL para L4063 y L4064.

Comparación de marcadores de memoria en el producto final TIL:

[1667] La Figura 84 muestra los marcadores de memoria del producto final TIL que se determinaron mediante citometría de flujo multicolor. Las muestras congeladas de TIL recogidas el día 16 se tiñeron para su análisis. El estado de la memoria TIL era comparable entre los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1. Figura 84: Análisis de marcadores de memoria del producto TIL para L4063 y L4064.

Comparación de marcadores de activación y agotamiento en el producto final TIL:

[1668] Las Figuras 85 y 86 muestran la activación y el agotamiento del producto final de TIL que se determinaron mediante citometría de flujo multicolor. Los marcadores de activación y agotamiento fueron comparables entre los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1 activados en células CD4+ (Figura 85) y CD8+ (Figura 86). Figura 85: Marcadores de activación y agotamiento activados en células CD4+ para L4063 y L4064. Figura 86: Marcadores de activación y agotamiento activados en células CD8+ para L4063 y L4064.

Secreción de interferón gamma tras la reestimulación:

[1669] Los TIL recolectados se sometieron a una nueva estimulación durante la noche con placas recubiertas de anti-CD3 para L4063 y L4064. Se observó una mayor producción de IFNγ a partir del proceso Gen 3.1 en los dos tumores analizados en comparación con el proceso Gen 3.0. La producción de IFNγ en cada condición se muestra en la Figura 87. Figura 87: Producción de IFN-γ (pg/mL) para el producto final en los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1.

Medición de los niveles de IL-2 en los medios de cultivo

[1670] Para comparar los niveles de consumo de IL-2 entre todas las condiciones y procesos, se recogieron sobrenadantes celulares al inicio de la reactivación en el Día 7, en el Día 10 de ampliación (L4064) / 11 (L4063), y en el Día 16/17 de recolección, y se congelaron. Posteriormente se descongelaron los sobrenadantes y se analizaron. La cantidad de IL-2 en el sobrenadante del cultivo celular se midió según el protocolo del fabricante. Los datos se muestran en la figura 88.

[1671] En general, los procesos Gen 3 y Gen 3.1 fueron comparables en términos de consumo de IL-2 durante el proceso completo evaluado en las mismas condiciones de medios. Figura 88: Análisis de la concentración de IL-2 (pg/mL) en los medios usados recogidos para L4063 y L4064.

Análisis de metabolitos

[1672] Se recogieron sobrenadantes de medios gastados de L4063 y L4064 al inicio de la reactivación en el día 7, a escala en el día 10 (L4064) o en el día 11 (L4063), y en la recolección en los días 16/17 para L4063 y L4064, para cada condición. Los sobrenadantes se analizaron en un bioanalizador CEDEX para determinar las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina, glutamax y amoníaco. La Figura 89 muestra la concentración de glucosa en los medios usados recogidos para los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1 para los tumores L4063 y L4064.

[1673] Los medios definidos tienen una mayor concentración de glucosa de 4,5 g/L en comparación con los medios completos (2g/L). En general, la concentración y el consumo de glucosa fueron comparables para los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1 dentro de cada tipo de medio. Figura 89: Concentración de glucosa (g/L) en los medios usados para L4063 y L4064.

[1674] Se observó un aumento del lactato en ambos tumores, L4063 y L4064, en todas las condiciones de ensayo. El aumento del lactato fue comparable entre las condiciones Gen 3.0 y Gen 3.1 y entre los dos medios utilizados para la expansión de la reactivación (medio completo para L4063 y medio definido para L4064).

[1675] La Figura 90 muestra la concentración de lactato en los medios usados recogidos para las condiciones de los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1 para ambos tumores L4063 y L4064. **Figura 90:** Concentración de lactato (g/L) en los medios usados para L4063 y L4064.

[1676] En el caso del L4063, el medio basal estándar contenía 2 mM de L-glutamina y se complementó con 2 mM de glutamax para compensar la degradación natural de la L-glutamina en condiciones de cultivo a L-glutamato y amoníaco.

[1677] Para el tumor L4064, el medio definido (libre de suero) utilizado no contenía L-glutamina en el medio basal, y se suplementó únicamente con glutamax hasta una concentración final de 2mM. Glutamax es un dipéptido de L-alanina y L-glutamina, es más estable que la L-glutamina en soluciones acuosas y no se degrada espontáneamente en glutamato y amoníaco. En su lugar, el dipéptido se disocia gradualmente en los aminoácidos individuales, manteniendo así una concentración menor pero suficiente de L-glutamina para sostener un crecimiento celular robusto. La Figura 91 y la Figura 92 muestran la concentración de glutamina y glutamax respectivamente en los medios usados recogidos en condiciones de proceso Gen 3.0 y Gen 3.1 para ambos tumores L4063 y L4064.

[1678] Para el L4063, la concentración de glutamina y glutamax disminuyó ligeramente en el día de escalado, pero en el día de recolección mostró un aumento a niveles similares o más cercanos en comparación con el día de reactivación. En el caso del L4064, la concentración de glutamina y glutamax mostró una ligera degradación a un ritmo similar entre las diferentes condiciones, durante todo el proceso. Figura 91: Concentración de glutamina (mmol/L) en los medios usados para L4063 y L4064. Figura 92: Concentración de glutamax (mmol/L) en los medios usados para L4063 y L4064.

[1679] La Figura 93 muestra la concentración de amoníaco en los medios usados recogidos para los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1 para los tumores L4063 y L4064. Como era de esperar, las concentraciones de amoníaco fueron mayores para L4063 (cultivado en medio estándar con 2 mM de glutamina + 2 mM de glutamax) que para L4064 (cultivado en medio definido con 2 mM de glutamax). Además, como era de esperar, se produjo un aumento o acumulación gradual de amoníaco a lo largo del cultivo. No hubo diferencias en las concentraciones de amoníaco en las tres condiciones de ensayo. Figura 93: Concentración de amoníaco (mmol/L) en los medios usados para L4063 y L4064.

Repeticiones de telómeros por Flow - FISH:

[1680] Se utilizó la tecnología Flow-FISH para medir la longitud media de la repetición telomérica en L4063 y L4064 bajo los procesos Gen 3 y Gen 3.1. La determinación de la longitud telomérica relativa (RTL) se calculó utilizando el kit Telomere PNA/FITC para análisis por citometría de flujo de DAKO. Se realizó el ensayo de los telómeros.

[1681] La longitud de los telómeros en muestras de L4063 y L4064, se compararon con una línea celular de control (1301 leucemia). La línea celular de control es una línea celular tetraploide con telómeros largos estables, que permite calcular una longitud telomérica relativa. Los procesos Gen 3 y Gen 3.1 evaluados en ambos tumores mostraron una longitud de telómeros comparable, como se muestra en la Figura 94. Figura 94: Resumen de la longitud relativa de los telómeros (RTL) en comparación con la línea celular de control (1301).

Análisis del repertorio TCR Vβ

[1682] Para determinar la diversidad clonal de los productos celulares generados en cada proceso, se ensayaron los productos finales de TIL para el análisis de la diversidad clonal mediante la secuenciación de la porción CDR3 de los receptores de células T.

[1683] Se compararon tres parámetros entre las tres condiciones:

Índice de diversidad de CDR3 únicas (uCDR3)

% compartido uCDR3

Para el 80% superior de uCDR3:

- o Comparar el % de copias uCDR3 compartidas
- o Comparar la frecuencia de clonotipos únicos

[1684] Figura 95: Resumen del repertorio TCR Vβ para L4063 y L4064. Describe la clonalidad de TIL para el producto final de TIL en el tumor L4063 y L4064 en condiciones Gen 3 y Gen 3.1 medida por el repertorio TCR Vβ.

[1685] Figura 97: Comparación entre Gen 3 y Gen3.1 Control y Gen 3.1 Test, porcentaje de secuencias CDR3 únicas

compartidas en L4063 en el producto celular recolecciónd o de TIL para: 975 secuencias son compartidas entre Gen 3 y Gen 3.1 producto final de prueba, lo que equivale al 88% del 80% superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 3 compartidas con Gen 3.1 producto final de prueba.

[1686] Figura 96: L4063 Comparación de frecuencia de secuencias CDR3 únicas en el producto celular final recolecciónd o de TIL entre los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1.

[1687] Figura 98: Comparación entre Gen 3 y Gen3.1 Control y Gen 3.1 Test, porcentaje de secuencias CDR3 únicas compartidas en L4064 en el producto celular recolecciónd o de TIL para: 2163 secuencias son compartidas entre Gen 3 y Gen 3.1 producto final de prueba, lo que equivale al 87% del 80% superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 3 compartidas con Gen 3.1 producto final de prueba.

[1688] Figura 99: L4064 Comparación de frecuencias de secuencias CDR3 únicas en el producto celular final recolecciónd o de TIL entre los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1.

[1689] Número de secuencias CD3 únicas identificadas a partir de 1×10^6 células recogidas el día 16 de la recolección, para los diferentes procesos. La condición de prueba Gen 3.1 mostró una diversidad clonal ligeramente superior en comparación con Gen 3.0 basándose en el número de CDR de péptidos únicos dentro de la muestra.

[1690] El índice de diversidad de entropía de Shanon es una métrica más fiable y común para la comparación, para las condiciones Gen 3.1 en ambos tumores mostró una diversidad ligeramente mayor que el proceso Gen 3, lo que sugiere que el repertorio TCR Vβ para la condición de prueba Gen 3.1 es más policlonal que el proceso Gen 3.0.

[1691] Además, el repertorio TCR Vβ para la condición de prueba Gen 3.1 mostró más de un 87% de solapamiento con el repertorio correspondiente para el proceso Gen 3.0 tanto en el tumor L4063 como en el L4064.

INFORMACIÓN ADICIONAL

[1692] El valor de la concentración de IL-2 en los medios usados para la prueba Gen 3.1 L4064 el día de la reactivación estaba por debajo del valor esperado (similar al control Gen 3.1 y a la condición Gen 3.0).

[1693] El bajo valor podría deberse a un error de pipeteo, pero debido a la mínima muestra tomada no fue posible repetir el ensayo.

[1694] No se recogieron los medios usados del día 10/11 en la muestra L4064 y no se incluyeron en el análisis de la concentración de IL-2 ni en el análisis de metabolitos en el sobrenadante.

CONCLUSIONES

[1695] La condición de prueba Gen 3.1 incluyendo alimentadores y OKT-3 en el día 0 mostró un mayor TVC de dosis de células en el día de recolección 16 comparado con el Gen 3.0 y el Gen 3.1 control. La TVC del producto final para la condición de prueba Gen 3.1 fue unas 2,5 veces superior al de Gen 3.0.

[1696] La condición de prueba Gen 3.1 con la adición de OKT-3 y alimentadores en el día 0, para ambos tumores L4063 y L4064, alcanzó una capacidad máxima del matraz en la recolección. En estas condiciones, si se inicia un máximo de 4 frascos en el día 0, la dosis final de células podría estar entre 80 - 100E+09 TILs.

[1697] Todos los atributos de calidad tales como la caracterización fenotípica incluyendo pureza, agotamiento, activación y marcadores de memoria en el producto final TIL se mantuvieron y fueron comparables entre la prueba Gen 3.1 y el proceso Gen 3.0. La longitud de los telómeros en el producto final TIL y el consumo de IL-2 en los medios usados fueron comparables entre los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1.

[1698] La producción de IFN gamma en el producto final de TIL fue 3 veces superior en Gen 3.1 con adición de alimentador y OKT-3 en el día 0, en comparación con Gen 3.0 en los dos tumores analizados, lo que sugiere que el proceso Gen 3.1 generó un potente producto de TIL.

[1699] No se observaron diferencias en los niveles de glucosa o lactato en las distintas condiciones de prueba. No se observaron diferencias en la glutamina y el amoníaco entre los procesos Gen 3.0 y Gen 3.1 en todas las condiciones de los medios. Los bajos niveles de glutamina en los medios no limitan el crecimiento celular y sugieren que la adición de glutamax sólo en los medios es suficiente para aportar los nutrientes necesarios para que las células proliferen.

[1700] El día de escalado para L4063 y L4064 fue el día 11 y el día 10 respectivamente y no mostraron grandes diferencias en cuanto al número de células alcanzado el día de recolección del proceso y el consumo de metabolitos fue comparable en ambos casos durante todo el proceso. Esta observación sugiere que el proceso optimizado Gen 3.0 puede tener flexibilidad en los días de procesamiento, facilitando así la flexibilidad en el programa de fabricación.

[1701] El proceso Gen 3.1 con adición de alimentador y OKT-3 el día 0 mostró una mayor diversidad clonal medida por el análisis de la secuencia CDR3 TCRab en comparación con el Gen 3.0.

[1702] La Figura 100 describe una realización del proceso Gen 3 (proceso optimizado Gen 3). Los medios estándar y los medios sin suero CTS Optimizer pueden utilizarse para la expansión de TIL del proceso Gen 3 Optimized. En el caso del CTS Optimizer se recomienda utilizar un medio sin suero para aumentar el glutamax en el medio hasta la concentración final de 4mM.

Viabilidad y comparabilidad:

Viabilidad:

[1703] Se estableció la viabilidad para todas las condiciones de estudio en todos los experimentos. En todos los experimentos y condiciones y entre el tejido tumoral donante, todos los experimentos se realizaron utilizando los mismos lotes de materia prima crítica como IL-2, suero humano-AB, células alimentadoras alogénicas, OKT-3.

Comparabilidad:

[1704] La comparabilidad se determinó por la capacidad de cualquier brazo del estudio para cumplir los criterios de liberación de nuestro producto clínico según Linfocitos Infiltrantes en Tumores (TIL) Autólogos LFP-002 criopreservados Día 22, como se indica en la Figura 101.

EJEMPLO 16: PROCESOS DE EXPANSIÓN TUMORAL CON MEDIO DEFINIDO.

[1705] Los procesos divulgados en los Ejemplos 7 a 15 se realizan sustituyendo los medios CM1 y CM2 por un medio definido según la presente invención (por ejemplo, CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, ThermoFisher, incluyendo por ejemplo DM1 y DM2).

EJEMPLO 17: ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE FASE 2 DE LINFOCITOS AUTÓLOGOS INFILTRANTES DE TUMORES EN PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Resumen

[1706] Este ejemplo describe un estudio de Fase 2 prospectivo, abierto, de cohortes múltiples, no aleatorizado, y multicéntrico que evalúa la ACT usando TIL en combinación con pembrolizumab o TIL como terapia única, usando TIL preparados como se describe en la presente solicitud así como en este ejemplo.

Objetivos:

Primario:

[1707] Evaluar la eficacia de TIL autólogo en combinación con pembrolizumab en pacientes con MM, HNSCC, o NSCLC o TIL como terapia única en pacientes con NSCLC en recaída o refractario (r/r), que habían progresado previamente en o después del tratamiento con CPIs, según lo determinado por la tasa de respuesta objetiva (ORR), utilizando los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST 1.1), según la evaluación del investigador.

[1708] Caracterizar el perfil de seguridad de TIL en combinación con pembrolizumab en pacientes con MM, HNSCC, y NSCLC o TIL como tratamiento único en pacientes con NSCLC r/r, medido por la incidencia de acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAEs) de grado ≥ 3.

Secundario:

[1709] Evaluar más a fondo la eficacia de TIL autólogo en combinación con pembrolizumab en pacientes con MM, HNSCC, y NSCLC o TIL como terapia única en pacientes con NSCLC r/r utilizando la tasa de respuesta completa (CR), la duración de la respuesta (DOR), la tasa de control de la enfermedad (DCR), la supervivencia libre de progresión (PFS) utilizando RECIST 1.1, según la evaluación del investigador, y la supervivencia global (OS).

Cohortes:

[1710] Cohorte 1A: Terapia TIL en combinación con pembrolizumab en pacientes con estadio IIIC o estadio IV irresecable o MM con ≤ 3 líneas previas de terapia sistémica excluyendo inmunoterapia. Si han sido tratados previamente, los pacientes deben haber tenido una progresión radiográficamente documentada en o después de la terapia más reciente.

[1711] Cohorte 2A: Terapia TIL en combinación con pembrolizumab en pacientes con HNSCC avanzado, recurrente o

metastásico (por ejemplo, estadios T1N1-N2B, T2-4N0-N2b) con ≤ 3 líneas previas de terapia sistémica, excluida la inmunoterapia. Si han sido tratados previamente, los pacientes deben haber tenido una progresión radiográficamente documentada en o después de la terapia más reciente.

[1712] Cohorte 3A: Tratamiento con TIL en combinación con pembrolizumab en pacientes con NSCLC localmente avanzado o metastásico (estadio III-IV) con ≤3 líneas previas de tratamiento sistémico, excluida la inmunoterapia. Si han sido tratados previamente, los pacientes deben haber tenido una progresión radiográficamente documentada en o después de la terapia más reciente.

[1713] Cohorte 3B: Terapia con TIL como agente único en pacientes con NSCLC en estadio III o estadio IV que hayan recibido previamente terapia sistémica con IPC (por ejemplo, anti-PD-1/anti-PD-L1) como parte de ≤ 3 líneas previas de terapia sistémica. Si han sido tratados previamente, los pacientes deben haber tenido una progresión radiográficamente documentada en o después de la terapia más reciente.

[1714] Los pacientes de las cohortes 3A y 3B (NSCLC) con tumores impulsados por oncogenes con terapia dirigida eficaz disponible deben haber recibido al menos una línea de terapia dirigida.

[1715] Todos los pacientes recibieron terapia con TIL criopreservados autólogos (con o sin pembrolizumab, según la asignación a la cohorte), precedida de un régimen de preacondicionamiento con linfodepleción no mieloablativa (NMA-LD) consistente en ciclofosfamida y fludarabina. Tras la infusión de TIL, se administraron hasta 6 dosis IV máximas de interleucina-2 (IL-2).

[1716] Los siguientes periodos generales de estudio tuvieron lugar en las 4 cohortes, a menos que se especifique lo contrario.

[1717] Cribado y resección tumoral: Hasta 4 semanas (28 días) desde la entrada en el estudio; fabricación del Producto TIL: aproximadamente ≤22 días desde la resección del tumor; y periodo de tratamiento, como se comenta más adelante.

[1718] Periodo de tratamiento (Cohortes 1A, 2A, y 3A): hasta 2 años, incluyendo NMA-LD (7 días), infusión de TIL (1 día) seguida de administraciones de IL-2 (1 a 4 días). Los pacientes reciben una única infusión de pembrolizumab tras la finalización de la resección tumoral para la producción de TIL y las exploraciones basales, pero antes del inicio del régimen NMA-LD. La siguiente dosis de pembrolizumab no se administrará antes de la finalización de la IL-2 y continuará Q3W ± 3 días a partir de entonces durante ≤ 2 años (24 meses) o hasta la progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable, lo que ocurra primero. La visita de fin de tratamiento (EOT) tuvo lugar en los 30 días siguientes a la última dosis de pembrolizumab. La visita podría combinarse con la visita de fin de evaluación (EOA) si procede (*por ejemplo,* la interrupción de pembrolizumab se produjo en la progresión de la enfermedad o al inicio de un nuevo tratamiento contra el cáncer).

[1719] Periodo de tratamiento (Cohorte 3B): hasta 12 días, incluyendo NMA-LD (7 días), TIL, infusión (1 día) seguido de administraciones de IL-2 (1 a 4 días). La visita EOT tuvo lugar una vez que el paciente recibió la última dosis de IL-2. La visita EOT se realizó dentro de los 30 días siguientes a la interrupción del tratamiento y puede combinarse con cualquier visita programada que se produzca dentro de este intervalo durante el periodo de evaluación.

[1720] Período de evaluación: comenzó tras la infusión de TIL el Día 0 y finaliza tras la progresión de la enfermedad, con el inicio de un nuevo tratamiento contra el cáncer, la retirada parcial del consentimiento para las evaluaciones del estudio, o 5 años (Mes 60), lo que ocurra primero. La visita de fin de evaluación (EOA) tenía lugar una vez que el paciente alcanzaba la progresión de la enfermedad o iniciaba un nuevo tratamiento contra el cáncer.

[1721] La terapia autóloga TIL con los TIL preparados como se describe en el presente documento comprendió las siguientes etapas:

1. Resección del tumor para proporcionar el tejido autólogo que sirve como fuente del producto celular TIL;

2. Producto TIL producido en una instalación central de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP);

3. Un régimen de preacondicionamiento NMA-LD de 7 días;

4. Cohortes 1A, 2A y 3A: Los pacientes reciben una única infusión de pembrolizumab tras la finalización de la resección de su tumor para la producción de TIL y las exploraciones basales, pero antes del inicio del régimen NMA-LD. La siguiente dosis de pembrolizumab no se administrará antes de la finalización de la IL-2 y continuará Q3W ± 3 días después.

5. Infusión del producto TIL autólogo (Día 0); y

6. Administraciones IV de IL-2 hasta un máximo de 6 dosis.

[1722] En las cohortes 1A, 2A, y 3A, la siguiente dosis de pembrolizumab no fue antes de la finalización de la IL-2 y continuó Q3W ± 3 días a partir de entonces durante ≤ 2 años (24 meses), o hasta la progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable, lo que ocurriera primero.

[1723] Los organigramas de las cohortes 1A, 2A, y 3A se encuentran en la Figura 7. El diagrama de flujo de la cohorte 3B figura en la figura 8. Los pacientes fueron asignados a la cohorte apropiada por indicación tumoral.

Terapia TIL + Pembrolizumab (Cohortes 1A, 2A, y 3A)

[1724] Se seleccionó a los pacientes y se les programó una intervención quirúrgica para la resección del tumor. A continuación, a los pacientes se les resecaban una o más lesiones tumorales, que se enviaban a una planta de fabricación central para la producción de TIL.

[1725] A continuación, se imitó el régimen NMA-LD, que consistía en 2 días de ciclofosfamida IV (60 mg/kg) con mesna (según la norma de tratamiento del centro o USPI/SmPC) los días -7 y -6, seguidos de 5 días de fludarabina IV (25 mg/m2: Día -5 hasta Día -1).

[1726] Los pacientes de las cohortes 1A, 2A, y 3A recibieron una única infusión de pembrolizumab tras la finalización de la resección tumoral para la producción de TIL y las exploraciones basales y antes del inicio del régimen NMA-LD. Las administraciones de IL-2 a una dosis de 600.000 UI/kg IV comenzaron tan pronto como 3 horas después, pero no más tarde de 24 horas después, de la finalización de la infusión de TIL el Día 0. Se administrarán administraciones adicionales de IL-2 aproximadamente cada 8 a 12 horas hasta un máximo de 6 dosis. La segunda dosis de pembrolizumab no se administró antes de finalizar el tratamiento con IL-2. Los pacientes deben haberse recuperado de todas las toxicidades relacionadas con IL-2 (Grado ≤2), antes de la segunda administración de pembrolizumab. Pembrolizumab continuará Q3W ± 3 días después durante ≤2 años (24 meses) o hasta la progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable, lo que ocurra primero.

Terapia con TIL como agente único (Cohorte 3B)

[1727] Se seleccionó a los pacientes y se les programó una intervención quirúrgica para la resección del tumor. A continuación, a los pacientes se les resecaban una o más lesiones tumorales, que se enviaban a una planta de fabricación central para la producción de TIL.

[1728] A continuación, el régimen NMA-LD consistió en 2 días de ciclofosfamida IV (60 mg/kg) con mesna (según la norma de tratamiento del centro o USPI/SmPC) el Día -7 y el Día -6, seguidos de 5 días de fludarabina IV (25 mg/m2: Día -5 hasta Día -1).

[1729] La infusión del producto TIL autólogo derivado del tumor se produjo no antes de 24 horas después de la última dosis de fludarabina. Las administraciones de IL-2 a una dosis de 600.000 UI/kg IV pueden haber comenzado tan pronto como 3 horas después, pero no más tarde de 24 horas después, de la finalización de la infusión de TIL.

[1730] Se administraron administraciones adicionales de IL-2 aproximadamente cada 8 a 12 horas hasta un máximo de 6 dosis.

Producción y expansión de linfocitos infiltrantes de tumores

[1731] El producto celular autólogo TIL estaba compuesto por linfocitos T citotóxicos viables derivados del tumor/lesión de un paciente, que se fabrican ex vivo en una instalación central GMP. En la Figura 9, por ejemplo, se muestra un diagrama de flujo ilustrativo del proceso de producción de TIL.

[1732] El proceso de fabricación de TIL comenzó en el centro clínico tras la escisión quirúrgica de una lesión o lesiones tumorales metastásicas primarias o secundarias de ≥1,5 cm de diámetro en cada paciente individual. Se pueden extirpar múltiples lesiones tumorales de diversas localizaciones anatómicas para compilar un agregado total de tejido tumoral; sin embargo, el agregado no debe superar los 4,0 cm de diámetro, ni los 10 g de peso, debido a la cantidad limitada de medio de bioconservación presente en la botella de transporte.

[1733] Una vez que la(s) lesión(es) tumoral(es) ha(n) sido colocada(s) en el frasco de transporte para bioconservación, se envía a una temperatura de entre 2°C y 8°C utilizando un servicio de mensajería urgente a una instalación central de fabricación GMP. A su llegada, las muestras tumorales se diseccionaron en fragmentos, que luego se cultivaron en un protocolo de expansión pre-rápida (Pre-REP) con IL-2 recombinante humana durante ~11 días.

[1734] Estas células pre-REP se expandieron posteriormente utilizando un protocolo de expansión rápida (REP) durante 11 días en presencia de IL-2, OKT3 (un anticuerpo monoclonal murino frente a CD3 humano, también conocido como [muromonab-CD3]) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) alogénicas irradiadas como células alimentadoras.

[1735] A continuación, las células expandidas se recolectaron, lavaron, formularon, crioconservaron y enviaron al centro clínico a través de un servicio de mensajería urgente. La forma de dosificación del producto celular TIL era una "suspensión de células vivas" autóloga crioconservada que estaba lista para la infusión en el paciente del que procedían los TIL. Los pacientes debían recibir la dosis completa del producto fabricado y liberado, que contenía entre 1 $\times 10^9$ y 150 $\times 10^9$ células viables según la especificación del producto. La experiencia clínica indicó que se consiguieron respuestas tumorales objetivas en este intervalo de dosis, que también ha demostrado ser seguro (Radvanyi L.G., et al., Clin Cancer Res. 2012;18(24):6758-70). La dosis completa de producto se suministraba en hasta cuatro bolsas de infusión.

Preparación de los pacientes para recibir el producto celular TIL

[1736] El régimen de preacondicionamiento NMA-LD utilizado en este estudio (es decir, 2 días de ciclofosfamida más mesna, seguidos de 5 días de fludarabina) se basó en el método desarrollado y probado por el Instituto Nacional del Cáncer (Rosenberg S.A., et al., Clin Cancer Res. 2011;17(13):4550-7; Radvanyi L.G., et al., Clin Cancer Res. 2012;18(24):6758-70; Dudley M.E., et al., J Clin Oncol. 2008;26(32):5233-9; Pilon-Thomas S, et al., J Immunother. 2012;35(8):615-20; Dudley M.E., et al., J Clin Oncol. 2005;23(10):2346-57; y Dudley M.E., et al., Science. 2002;298(5594):850-4). Tras el régimen de preacondicionamiento de 7 días, se infundió al paciente el producto celular TIL.

[1737] La infusión de TIL fue seguida por la administración de IL-2 IV (600.000 UI/kg) cada 8 a 12 horas, con la primera dosis administrada entre 3 y 24 horas después de la finalización de la infusión de TIL y continuando hasta un máximo de 6 dosis. Según las normas institucionales, las dosis de IL-2 pueden calcularse en función del peso real.

SELECCIÓN DE POBLACIONES DE PACIENTES

Cohorte 1A:

[1738] Los pacientes tenían un diagnóstico confirmado de MM irresecable (estadio IIIC o estadio IV, confirmado histológicamente según el sistema de estadificación del American Joint Committee on Cancer [AJCC]). Se excluyeron los pacientes con melanoma ocular. Los pacientes no deben haber recibido previamente agentes inmuno-oncológicos dirigidos. Si la mutación BRAF es positiva, el paciente puede haber recibido una terapia previa dirigida a BRAF/MEK.

Cohorte 2A:

[1739] Los pacientes tenían un HNSCC avanzado, recidivante y/o metastásico y pueden no haber recibido tratamiento; se requiere un diagnóstico histológico del tumor primario a través del informe patológico. Los pacientes no deben haber recibido regímenes previos de inmunoterapia.

Cohorte 3A:

[1740] Los pacientes tenían un diagnóstico confirmado de NSCLC en estadio III o estadio IV (escamoso, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes). Los pacientes con tumores impulsados por oncogenes con terapia dirigida eficaz disponible habían recibido al menos una línea de terapia dirigida.

Cohorte 3B:

[1741] Los pacientes tenían un diagnóstico confirmado de NSCLC en estadio III o estadio IV (escamoso, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes) y habían recibido previamente terapia sistémica con CPIs (*por ejemplo,* anti-PD-1/anti-PD-L1). Los pacientes con tumores impulsados por oncogenes con terapia dirigida eficaz disponible habían recibido al menos una línea de terapia dirigida.

[1742] Todos los pacientes habían recibido hasta 3 tratamientos anticancerosos sistémicos previos (véanse los criterios de inclusión más abajo), excluida la inmunoterapia para las cohortes 1A, 2A, y 3A. Si habían sido tratados previamente, los pacientes tenían una progresión radiográficamente confirmada en o después de la terapia más reciente.

Criterios de inclusión

[1743] Los pacientes deben cumplir TODOS los siguientes criterios de inclusión para participar en el estudio:

1. Todos los pacientes tenían un diagnóstico histológico o patológico confirmado de neoplasia maligna de sus respectivas histologías:

o Melanoma no resecable o metastásico (Cohorte 1A)

o Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello avanzado, recurrente o metastásico (Cohorte 2A)

o NSCLC en estadio III o estadio IV (escamoso, no escamoso, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes) (cohortes 3A y 3B).

2. Sólo cohortes 1A, 2A, y 3A: Los pacientes no habían recibido inmunoterapia. Si habían sido tratados previamente, los pacientes habían progresado durante o después de la terapia más reciente. Las cohortes 1A, 2A, y 3A pueden haber recibido hasta 3 terapias sistémicas previas contra el cáncer, en concreto:

◦ En la cohorte 1A: Pacientes con melanoma irresecable o metastásico (estadio IIIC o estadio IV); si la mutación BRAF es positiva, los pacientes podrían haber recibido un inhibidor de BRAF.

◦ En la cohorte 2A: Pacientes con HNSCC irresecable o metastásico. Se permitió a los que habían recibido quimio-radioterapia inicial.

◦ En la cohorte 3A: Pacientes con NSCLC en estadio III o estadio IV (escamoso, no escamoso, adenocarcinoma o carcinoma de células grandes) que no han recibido inmunoterapia y que han progresado después de ≤3 líneas de tratamiento sistémico previo en el contexto local avanzado o metastásico. Los pacientes que recibieron terapia sistémica en el contexto adyuvante o neoadyuvante, o como parte de la quimiorradioterapia definitiva, fueron elegibles y se consideró que habían recibido una línea de terapia si la enfermedad había progresado en los 12 meses siguientes a la finalización de la terapia sistémica previa. Los pacientes con impulsores oncogénicos conocidos (por ejemplo, EGFR, ALK, ROS) que presentaban mutaciones sensibles a terapias dirigidas debían haber progresado tras al menos 1 línea de terapia dirigida.

3. Sólo cohorte 3B: Pacientes con NSCLC en estadio III o estadio IV (escamoso, no escamoso, adenocarcinoma o carcinoma de células grandes) que habían recibido previamente terapia sistémica con CPIs (*por ejemplo,* anti-PD-1/anti-PD-L1) como parte de ≤ 3 líneas previas de terapia sistémica.

◦ Pacientes con progresión radiográficamente confirmada en o después de la terapia más reciente.

◦ Los pacientes que recibieron terapia sistémica en el contexto adyuvante o neoadyuvante, o como parte de la quimiorradioterapia definitiva, fueron elegibles y se consideró que habían recibido 1 línea de terapia si la enfermedad había progresado en los 12 meses siguientes a la finalización de la terapia sistémica previa.

o Los pacientes con impulsores oncogénicos conocidos (*por ejemplo,* EGFR, ALK, ROS) que presentaban mutaciones sensibles a terapias dirigidas debían haber progresado tras al menos 1 línea de terapia dirigida.

4. Los pacientes tenían al menos 1 lesión resecable (o lesiones agregadas) de un mínimo de 1,5 cm de diámetro tras la resección para la producción del producto en investigación TIL. Se animó a obtener tejido tumoral de lesiones metastásicas múltiples y diversas, siempre que la resección quirúrgica no supusiera riesgos adicionales para el paciente.

◦ Si la lesión considerada para resección para generación de TIL está dentro de un campo previamente irradiado, la lesión debe haber demostrado progresión radiográfica antes de la resección.

◦ Los pacientes deben tener una muestra histopatológica adecuada para las pruebas requeridas por el protocolo.

5. Los pacientes tenían enfermedad medible remanente según la definición de las directrices RECIST 1.1 estándar y bien conocidas (*véase*, por ejemplo, Eisenhauer, European Journal of Cancer 45:228-247 (2009), también disponible en la World Wide Web en project.eortc.org/recist/wp-content/uploads/sites/4/2015/03/RECISTGuidelines.pdf) tras la resección tumoral para la fabricación de TIL:

o Las lesiones en zonas previamente irradiadas no se seleccionaron como lesiones diana a menos que se hubiera demostrado una progresión de la enfermedad en dichas lesiones;

o Las lesiones que se resecaron parcialmente para la generación de TIL que seguían siendo mensurables según RECIST pueden seleccionarse como lesiones no diana, pero no podrían servir como lesión diana para la evaluación de la respuesta.

6. Los pacientes tenían ≥ 18 años en el momento del consentimiento.

7. Los pacientes tenían un estado funcional de 0 o 1 según el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) y una esperanza de vida estimada de ≥3 meses.

8. Las pacientes en edad fértil o con parejas en edad fértil tenían que estar dispuestas a practicar un método anticonceptivo aprobado de alta eficacia durante el tratamiento y continuar durante 12 meses después de recibir toda la terapia relacionada con el protocolo (Nota: Las mujeres en edad fértil debían utilizar métodos anticonceptivos eficaces durante el tratamiento y durante los 12 meses posteriores a la última dosis de IL-2, o 4 meses después de la última dosis de pembrolizumab (lo que ocurriera más tarde). Los varones no podían donar esperma durante el estudio o durante los 12 meses siguientes a la interrupción del tratamiento, lo que ocurriera más tarde.

9. Los pacientes presentaban los siguientes parámetros hematológicos:

- o Recuento absoluto de neutrófilos (ANC) ≥1000/mm3;
- o Hemoglobina ≥9,0 g/dL;
- o Recuento de plaquetas ≥100.000/mm3.

10. Los pacientes tenían una función orgánica adecuada:

- o Alanina aminotransferasa sérica (ALT)/transaminasa glutámico-pirúvica sérica (SGPT) y aspartato aminotransferasa (AST)/SGOT ≤3 veces el límite superior de la normalidad (ULN), pacientes con metástasis hepática ≤5 veces ULN.
- o Un aclaramiento de creatinina estimado ≥40 mL/min mediante la fórmula de Cockcroft Gault en el momento del cribado.
- ◦ Bilirrubina total ≤2 mg/dL.
- o Los pacientes con síndrome de Gilbert deben tener una bilirrubina total ≤3 mg/dL.

11. Los pacientes eran seronegativos para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV1 y HIV2). Los pacientes con serología positiva para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), el anticuerpo central de la hepatitis B (anti HBc) o el virus de la hepatitis C (anti-HCV) que indicaban una infección aguda o crónica se inscribieron en función de la carga vírica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la prevalencia local de determinadas exposiciones víricas.

12. Los pacientes tuvieron un periodo de lavado de la(s) terapia(s) anticancerosa(s) previa(s) de una duración mínima, como se detalla a continuación, antes del primer tratamiento del estudio *(es decir*, inicio de NMA-LD o pembrolizumab):

- o Terapia dirigida: se permitió la terapia dirigida previa con un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), MEK, BRAF, ALK, ROS1 u otros agentes dirigidos (p. ej., erlotinib, afatinib, dacomitinib, osimertinib, crizotinib, ceritinib, lorlatinib), siempre que el lavado sea de un mínimo de 14 días antes del inicio del tratamiento.
- o Quimioterapia: se permitió la quimioterapia/quimiorradiación adyuvante, neoadyuvante o definitiva siempre que el lavado sea de un mínimo de 21 días antes del inicio del tratamiento.
- ◦ Inmunoterapia solo para la cohorte 3B, se permitió una terapia previa dirigida a puntos de control con un anti-PD-1, otros mAbs o vacunas con un periodo de lavado de ≥ 21 días antes del inicio de la NMA-LD.
- o Radioterapia paliativa: se permitió la radioterapia externa previa siempre que todas las toxicidades relacionadas con la radiación se resolvieran a grado 1 o al inicio, excluyendo alopecia, cambios en la pigmentación de la piel u otros acontecimientos clínicamente insignificantes, por ejemplo, dermatitis por radiación en áreas pequeñas o urgencia rectal o urinaria.
- o La(s) lesión(es) tumoral(es) evaluada(s) como diana de respuesta mediante RECIST 1.1 estaba(n) fuera del portal de radiación; sin embargo, si estaba(n) dentro del portal, debía(n) haber demostrado progresión (ver Criterio de Inclusión más arriba).

◦ Cirugía/procedimiento preplanificado: se permitió(n) procedimiento(s) quirúrgico(s) previo(s) siempre que se hubiera(n) producido la cicatrización de la herida, se hubieran resuelto todas las complicaciones y hubieran transcurrido al menos 14 días (para procedimientos quirúrgicos mayores) antes de la resección del tumor.

13. Los pacientes se habían recuperado de todos los acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento anticanceroso (TRAE) previos hasta el Grado ≤1 (según los Criterios Terminológicos Comunes para los Acontecimientos Adversos [CTCAE]), excepto de la alopecia o el vitíligo, antes de la asignación a la cohorte.

14. Los pacientes con toxicidad estable de grado ≥2 de un tratamiento previo contra el cáncer se consideraron caso por caso tras consultar con el supervisor médico.

15. Los pacientes de las cohortes 1A, 2A, y 3A con toxicidad irreversible que no se esperaba razonablemente que se viera exacerbada por el tratamiento con pembrolizumab se incluyeron únicamente tras consultar con el Monitor Médico. Solo para los pacientes de la Cohorte 3B, los pacientes con diarrea o colitis documentada de Grado ≥2 o superior como resultado de un tratamiento previo con CPI(s) inhibidor(es) de puntos de control inmunitarios deben haber estado asintomáticos durante al menos 6 meses o haber tenido una colonoscopia normal por evaluación visual postratamiento antes de la resección tumoral.

16. Los pacientes deben haber autorizado por escrito el uso y la divulgación de información sanitaria protegida.

Criterios de exclusión

[1744] Los pacientes que cumplían CUALQUIERA de los siguientes criterios fueron excluidos del estudio:

1. Pacientes con melanoma de origen uveal/ocular

2. Pacientes que habían recibido un aloinjerto de órgano o una terapia de transferencia celular previa que incluía un régimen de quimioterapia no mieloablativo o mieloablativo en los últimos 20 años. (Nota: Este criterio era aplicable a los pacientes sometidos a retratamiento con TIL, con la excepción de que hubieran tenido un régimen NMA-LD previo con su tratamiento previo con TIL).

3. Pacientes con metástasis cerebrales sintomáticas y/o no tratadas.

◦ - Se tendrá en cuenta para la inscripción a los pacientes con metástasis cerebrales tratadas definitivamente.

previa discusión con el Monitor Médico; si, antes del inicio del tratamiento el paciente es

clínicamente estable durante ≥2 semanas, no hay nuevas lesiones cerebrales mediante resonancia magnética.

imágenes por resonancia magnética (MRI) después del tratamiento, y el paciente no requiere un

tratamiento con corticosteroides continuo.

4. Pacientes en tratamiento con esteroides sistémicos en los 21 días previos a la inscripción.

5. Pacientes embarazadas o en periodo de lactancia.

6. Pacientes con enfermedad(es) médica(s) activa(s) que, en opinión del investigador, suponga(n) un mayor riesgo para la participación en el estudio; como infecciones sistémicas (por ejemplo, sífilis o cualquier otra infección que requiera antibióticos), trastornos de la coagulación u otras enfermedades médicas importantes activas de los sistemas cardiovascular, respiratorio, o inmunitario.

7. Los pacientes no pueden tener trastornos autoinmunes o inflamatorios activos o documentados con anterioridad (incluyendo neumonitis, enfermedad inflamatoria intestinal [por ejemplo, colitis o enfermedad de Crohn], diverticulitis [con excepción de la diverticulosis], lupus eritematoso sistémico, síndrome de sarcoidosis o síndrome de Wegener [granulomatosis con poliangeítis, enfermedad de Graves, artritis reumatoide, hipofisitis, uveítis, etc.]). Las siguientes fueron excepciones a este criterio:

o Pacientes con vitíligo o alopecia.

◦ Pacientes con hipotiroidismo (por ejemplo, tras el síndrome de Hashimoto) estables en

o sustitución hormonal.

◦ Cualquier afección cutánea crónica que no requiriera tratamiento sistémico.

◦ Pacientes con enfermedad celíaca controlada sólo con dieta.

8. Pacientes que hayan recibido una vacuna viva o atenuada en los 28 días anteriores al inicio del tratamiento.

9. Pacientes que presentaban cualquier forma de inmunodeficiencia primaria (como la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave [SCID] y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida [AIDS]).

10. Pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a cualquier componente de los fármacos del estudio. Los TILs no se administraron a pacientes con hipersensibilidad conocida a cualquier componente de la formulación del producto TIL incluyendo, pero no limitado a, cualquiera de los siguientes:

o - NMA-LD (ciclofosfamida, mesna, y fludarabina)

o • Proleukin®, aldesleukin, IL-2

o - Antibióticos del grupo de los aminoglucósidos *(es decir,* estreptomicina, gentamicina [excluidos los que den negativo en la prueba cutánea de hipersensibilidad a la gentamicina]).

o - Cualquier componente de la formulación del producto TIL, incluido el dimetilsulfóxido.

o [DMSO], HSA, IL-2, y dextrano-40

o • Pembrolizumab

11. Pacientes con una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) <45% o que pertenezcan a la clase II o superior de la New York Heart Association. Una prueba de esfuerzo cardiaco que demuestre cualquier anomalía irreversible del movimiento de la pared en cualquier paciente ≥60 años de edad o en pacientes que tengan antecedentes de cardiopatía isquémica, dolor torácico o arritmias auriculares y/o ventriculares clínicamente significativas.

o Los pacientes con una prueba de esfuerzo cardiaco anormal podrían ser incluidos si tuvieran una fracción de eyección adecuada y autorización cardiológica con la aprobación del Monitor Médico del Patrocinador.

12. Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva o restrictiva y con un FEV1 (volumen espiratorio forzado en 1 segundo) documentado ≤60% de la predicción normal.

◦ - Si un paciente no podía realizar una espirometría fiable debido a una anatomía anómala de las vías respiratorias superiores (*es decir*, traqueostomía), se utilizó una prueba de marcha de 6 minutos para evaluar la función pulmonar. Se excluye a los pacientes que no fueron capaces de caminar una distancia de al menos el 80% de la prevista para su edad y sexo o que muestran signos de hipoxia en cualquier momento de la prueba (SpO2<90%).

13. Pacientes que hayan padecido otra neoplasia maligna primaria en los 3 años anteriores (excepto las que no requirieron tratamiento o habían sido tratadas curativamente hace más de 1 año y, a juicio del investigador, no presentaban un riesgo significativo de recurrencia, incluidos, entre otros, cáncer de piel no melanoma, CDIS, CLIS, cáncer de próstata con puntuación de Gleason ≤6 o cáncer de vejiga).

14. Participación en otro estudio clínico con un producto en investigación en los 21 días siguientes al inicio del tratamiento.

Criterios de valoración del estudio y análisis previstos

[1745] Los criterios de valoración primarios y secundarios se analizaron por separado según la cohorte.

Criterios de Valoración Primarios:

[1746] La ORR se definió como la proporción de pacientes que alcanzaron RP o CR confirmada como mejor respuesta según la evaluación de los investigadores según RECIST 1.1 entre el conjunto de análisis de eficacia.

[1747] La respuesta objetiva se evaluó por cada valoración de la enfermedad y la ORR se expresó como una proporción binomial con el correspondiente IC del 90% de 2 lados. El análisis primario para cada cohorte tuvo lugar cuando todos los pacientes tratados por cohorte tuvieron la oportunidad de ser seguidos durante 12 meses, a menos que progresaran/expiraran o se interrumpiera su tratamiento antes del periodo de evaluación.

[1748] El criterio de valoración primario de seguridad se midió por la tasa de incidencia de cualquier TEAE de grado 3 o superior dentro de cada cohorte expresada como proporciones binomiales con el correspondiente CI del 90% de 2 lados.

Criterios de Evaluación Secundarios:

Eficacia:

Los criterios secundarios de valoración de la eficacia se definieron del siguiente modo:

[1749] La tasa de CR se basa en los respondedores que alcanzaron una CR confirmada evaluada por los investigadores. La DCR se obtuvo como la suma del número de pacientes que alcanzaron una RP/RC confirmada o una DS sostenida (al menos 6 semanas) dividida por el número de pacientes del conjunto de análisis de eficacia × 100%. La tasa de CR y DCR se resumió mediante una estimación puntual y su CI del 90% de dos caras.

[1750] La DOR se definió entre los pacientes que alcanzaron una respuesta objetiva. Se midió desde la primera vez que se cumplieron los criterios de respuesta (PR/CR) hasta la primera fecha en que se documentó objetivamente la enfermedad recurrente o progresiva, o la recepción del tratamiento anticanceroso posterior o el fallecimiento del paciente (lo que se registrara primero). A los pacientes que no experimenten PD o que no hayan fallecido antes del momento del corte de datos o del bloqueo final de la base de datos se les censurarán los tiempos de los eventos en la última fecha en que se realice una evaluación adecuada del estado del tumor.

[1751] PFS se definió como el tiempo (en meses) transcurrido desde el momento de la linfodepleción hasta PD o la muerte por cualquier causa, lo que ocurriera antes. A los pacientes que no experimentaban PD o que no habían expirado en el momento del corte de datos o del bloqueo final de la base de datos se les censuraron los tiempos de los eventos en la última fecha en que se realizó una evaluación adecuada del estado del tumor.

[1752] OS se definió como el tiempo (en meses) transcurrido desde el momento de la linfodepleción hasta la muerte por cualquier causa. A los pacientes que no habían expirado en el momento del corte de datos o del bloqueo final de la base de datos se les censuraron los tiempos de los eventos en la última fecha de su estado de supervivencia conocido.

[1753] La DOR, PFS, y OS se sometieron a censura derecha. Se utilizará el método de Kaplan-Meier para resumir los criterios de valoración de la eficacia en función del tiempo transcurrido hasta el acontecimiento. Los datos de referencia para la evaluación del tumor fueron el último escáner antes de la linfodepleción para todas las cohortes.

[1754] Los parámetros de eficacia anteriores se estimarán para la cohorte aplicable para los subconjuntos definidos por las características basales de la enfermedad; estado de BRAF (sólo cohorte 1A), estado de HPV (sólo cohorte 2A), enfermedad pulmonar escamosa o no escamosa (sólo cohortes 3A y 3B) y estado anti-PD-L1.

EJEMPLO 18: ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE FASE 2 DE LINFOCITOS AUTÓLOGOS INFILTRANTES DE TUMORES EN PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS

[1755] El estudio de este ejemplo es un estudio de fase 2, multicéntrico, global y abierto de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) autólogos en pacientes con tumores sólidos seleccionados (melanoma metastásico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)). En el ejemplo se utiliza el producto TIL fabricado según los Ejemplos del presente documento, incluidos los Ejemplos 10-17, así como dresibido en toda la presente solicitud, que está criopreservado y tiene un proceso de fabricación de 22 días. Se administró una única infusión de producto TIL después de que los pacientes hubieran completado el régimen preparatorio de linfodepleción no mieloablativa con ciclofosfamida (60mg/kg x2 días) y fludarabina ($25mg^2/m$ × 5 días). Hay 4 cohortes de pacientes, como se describe a continuación:

Cohorte 1A (cohorte combinada): Pacientes con melanoma en estadio IIIC o IV irresecable o metastásico que no hayan recibido inmunoterapia y con ≤3 líneas previas de tratamiento sistémico. Estos pacientes recibirán el producto TIL en combinación con pembrolizumab.

Cohorte 2A (cohorte combinada): Pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello avanzado, recurrente o metastásico que no hayan recibido inmunoterapia y que hayan recibido ≤3 líneas de tratamiento sistémico previo. Estos pacientes recibirán el producto TIL en combinación con pembrolizumab.

Cohorte 3A (cohorte combinada): Pacientes con NSCLC localmente avanzado o metastásico (estadio III-IV) sin inmunoterapia con ≤3 líneas previas de tratamiento sistémico. Estos pacientes recibirán el producto TIL en combinación con pembrolizumab.

Cohorte 3B (cohorte de agente único): Pacientes con NSCLC en estadio III-IV que hayan recibido previamente terapia sistémica con inhibidores de puntos de control (anti-PD-1/anti-PD-L1) como parte de ≤3 líneas previas de terapia sistémica. Estos pacientes recibirán el producto TIL como agente único.

[1756] Dos pacientes con NSCLC se han inscrito en la Cohorte 3B (TIL sola post inhibidor de punto de control inmune) que habían completado su primera visita de evaluación de respuesta en el día 42) se describen a continuación.

[1757] La paciente A es una mujer de 63 años diagnosticada de adenocarcinoma de pulmón en estadio IVA. Había recibido 3 líneas previas de terapia sistémica que incluían pembrolizumab, carboplatino/bevacizumab y vinorelbina. Su mejor respuesta a la terapia previa con pembrolizumab fue enfermedad progresiva; a carboplatino/bevacizumab fue una respuesta parcial, y su respuesta a vinorelbina no fue evaluable (suspendió antes de la evaluación de la respuesta). Se sometió a una resección del lóbulo inferior izquierdo del pulmón para la generación de TIL y se le infundieron $3,75 \times 10^9$ células de producto TIL. La paciente tuvo su primera visita de evaluación de la respuesta (día 42), en la que la tomografía computarizada (CT) mostró una reducción del 4% en la carga tumoral en comparación con las exploraciones basales, lo que constituye una respuesta estable de la enfermedad según RECIST 1.1.

[1758] La paciente B es una mujer de 70 años diagnosticada de carcinoma basaloide de células escamosas en estadio IVB. Había recibido 3 líneas de tratamiento previas que incluían carboplatino/abraxano, nivolumab y cisplatino/gemcitabina. Su mejor respuesta a carbo/abraxane previo no fue evaluable (terapia interrumpida debido a toxicidad); a nivolumab fue enfermedad progresiva y para cisplatino/gemcitabina fue una respuesta parcial. Se le practicó una resección de la lesión esplénica para la generación de TIL y se le infundieron 39×10^9 células del producto TIL. La paciente tuvo su primera visita de evaluación de la respuesta (día 42), en la que las tomografías computarizadas mostraron una reducción del 44% de la carga tumoral en comparación con las tomografías basales, lo que constituye una respuesta parcial según RECIST 1.1.

REIVINDICACIONES

1. Una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) para su uso en un método de tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), el método comprende las etapas de:

(a) proporcionar una primera población de TIL obtenida y/o recibida de una resección quirúrgica, biopsia con aguja, biopsia de núcleo, biopsia pequeña, u otro medio para obtener una muestra que contenga una mezcla de células tumorales y TIL de un tumor de NSCLC de un paciente o proporcionar una primera población de TIL obtenida de un tumor resecado de un paciente que tenga NSCLC;
(b) poner en contacto fragmentos tumorales que comprenden la primera población de TIL con un primer medio de cultivo celular;
(c) realizar una expansión inicial de la primera población de TIL en el primer medio de cultura celular para obtener una segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 5 veces mayor en número que la primera población de TIL, donde el primer medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 (anticuerpo anti-CD3), y opcionalmente células presentadoras de antígeno (APCs) y además donde la expansión inicial se realiza durante un periodo de hasta o en 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días;
(d) realizar una expansión rápida de la segunda población de TIL en un segundo medio de cultura celular para obtener una tercera población de TIL, donde la tercera población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la segunda población de TIL después de 7 días desde el inicio de la expansión rápida; en el que el segundo medio de cultura celular comprende IL-2, OKT-3 (anticuerpo anti-CD3), y células presentadoras de antígeno (APC), que opcionalmente son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) alogénicas irradiadas; y en el que la expansión rápida se realiza durante un periodo de hasta o 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días, 9 días, 10 días u 11 días;
(e) recolección de la tercera población de TIL;
(f) administrar una porción terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL a un paciente con NSCLC;

donde el NSCLC es refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1.

2. La población de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) para uso según la reivindicación 1, en la que la expansión inicial se realiza durante 1 a 8 días y la segunda expansión se realiza durante 1 a 9 días.

3. La población de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) para uso según la reivindicación 1, en la que la expansión inicial se realiza durante 8 días y la segunda expansión se realiza durante 7 a 9 días.

4. La población de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) para uso según la reivindicación 1, en la que las APC se añaden en la etapa (c) en cualquier momento durante los días 4 a 7.

5. La población de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) para su uso según la reivindicación 1, en la que los TIL se recolecciónn el día 14 a 16 y en la que la porción terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL para su administración al paciente tiene 14 a 16 días.

6. La población de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) para su uso según la reivindicación 1, en la que la primera población de TILs se obtiene utilizando un método de muestreo multilesional.

7. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para uso según la reivindicación 1, donde el NSCLC refractario:

(a) ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-PD-L2;
(b) no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1;
(c) ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico;
(d) ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico;
(e) ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico;
(f) no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1 y ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico; o
(g) ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico.

8. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para uso según la reivindicación 1, donde: el NSCLC refractario tiene baja expresión de PD-L1, y en el que (a) el NSCLC refractario ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 o (b) el NSCLC refractario no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1, (c) el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico o (d) el NSCLC refractario ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico.

9. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para uso según la reivindicación 1, donde el NSCLC

refractario:

(a) no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1 y presenta enfermedad voluminosa al inicio del estudio;
(b) ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio;
(c) ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y presenta una enfermedad voluminosa en el momento inicial; o
(d) El NSCLC ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y tiene enfermedad voluminosa al inicio del estudio, opcionalmente en el que la enfermedad voluminosa se indica cuando el diámetro máximo del tumor es superior a 7 cm medido en el plano transversal o coronal o ganglios linfáticos inflamados con un diámetro en el eje corto de 20 mm o superior.

10. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para su uso según la reivindicación 1, donde el método comprende antes de la etapa b;
fragmentando el tumor en fragmentos tumorales.

11. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para su uso según cualquier reivindicación precedente, donde el tumor se reseca de uno o más sitios tumorales.

12. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para uso de la reivindicación 10, donde el NSCLC refractario:

(a) ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-PD-L2;
(b) no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1;
(c) ha sido tratado con un agente quimioterapéutico;
(d) ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico;
(e) no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1 y ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico; o
(f) ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico.

13. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para uso de la reivindicación 10, donde el NSCLC refractario tiene baja expresión de PD-L1, donde el NSCLC refractario:

(a) ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1;
(b) no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1
(c) ha sido tratado con un agente quimioterapéutico; o
(d) ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico.

14. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para uso de la reivindicación 10, donde el NSCLC refractario:

(a) no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-L1 y presenta enfermedad voluminosa al inicio del estudio;
(b) ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y tiene enfermedad voluminosa al inicio;
(c) ha sido tratado con un agente quimioterapéutico y presenta una enfermedad voluminosa en el momento inicial; o
(d) ha sido tratado con un agente quimioterapéutico pero no está siendo tratado actualmente con un agente quimioterapéutico y presenta enfermedad voluminosa en el momento basal, opcionalmente en el que dicha enfermedad voluminosa se indica cuando el diámetro máximo del tumor es superior a 7 cm medido en el plano transversal o coronal o ganglios linfáticos inflamados con un diámetro en el eje corto de 20 mm o superior.

15. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para uso de cualquier reivindicación precedente, donde:

(i) el NSCLC refractario es refractario al menos a dos tratamientos sistémicos previos, sin incluir terapias neoadyuvantes o adyuvantes, y/o en el que el NSCLC refractario es refractario a un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 seleccionado del grupo formado por nivolumab, pembrolizumab, JS001, TSR-042, pidilizumab, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, anti-PD-1 del clon: RMP1-14, durvalumab, atezolizumab, avelumab, y fragmentos de los mismos, en los que opcionalmente el NSCLC refractario es refractario a pembrolizumab; nivolumab; un anticuerpo anti-CTLA-4, tal como ipilimumab; un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab y pembrolizumab; un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab y nivolumab; durvalumab; atezolizumab; o avelumab; y/o
(ii) la IL-2 está presente a una concentración inicial de entre 1000 UI/mL y 6000 UI/mL en el primer medio de cultivo celular, donde opcionalmente la IL-2 está presente a una concentración inicial de entre 1000 UI/mL y 6000

UI/mL y el anticuerpo OKT-3 está presente a una concentración inicial de unos 30 ng/mL en el segundo medio de cultivo celular; y/o
(iii) la expansión inicial se realiza utilizando un recipiente permeable al gas y/o la expansión rápida se realiza utilizando un recipiente permeable al gas; y/o
(iv) el primer medio de cultivo celular comprende además una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, y combinaciones de las mismas y/o el segundo medio de cultivo celular comprende además una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-7, IL-15, IL- 21, y combinaciones de las mismas; y/o
(v) el método comprende además la etapa de tratar al paciente con un régimen de linfodepleción no mieloablativo antes de administrar la tercera población de TILs al paciente y/o en donde el método comprende además la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 que comienza el día después de la administración de la tercera población de TILs al paciente, en el que opcionalmente el régimen de linfodepleción no mieloablativo comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguida de administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días y/o el régimen de IL-2 es un régimen de IL-2 de dosis alta que comprende 600.000 o 720.000 UI/kg de aldesleukina, administrada como infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta tolerancia.

16. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el NSCLC es refractario a un tratamiento o terapia de combinación que comprende un anticuerpo anti-PD-1 y un agente quimioterapéutico, donde opcionalmente el anticuerpo anti-PD-1 o el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, JS001, TSR-042, pidilizumab, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, anti-PD-1 del clon: RMP1-14, durvalumab, atezolizumab, avelumab, y fragmentos de los mismos o el anti-PD-1 es pembrolizumab.

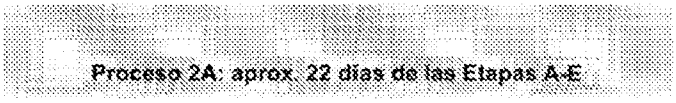
17. La población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para uso según la reivindicación 16, donde el agente quimioterapéutico es:

(i) un agente(s) quimioterapéutico(s) de doblete de platino, opcionalmente en el que la terapia de doblete de platino comprende:

(a) un primer agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en cisplatino y carboplatino, y
(b) un segundo agente quimioterapéutico seleccionado del grupo formado por vinorelbina, gemcitabina y un taxano (incluyendo, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel o nab-paclitaxel); y/o

(ii) en combinación con pemetrexed, en la que opcionalmente el NSCLC es refractario a una terapia de combinación que comprende carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, y cisplatino o el NSCLC es refractario a una terapia de combinación que comprende carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, cisplatino, nivolumab, e ipilimumab.

Figura 1



1. **ETAPA A**

Obtener Muestra Tumoral del Paciente

2. **ETAPA B**

Fragmentación y Primera Expansión

3 días a 14 días

3. **ETAPA C**

Primera Expansión a Segunda Transición de Expansión

Sin Almacenamiento y Sistema Cerrado

4. **ETAPA D**

Segunda Expansión

IL-2, OKT-3, y células alimentadoras presentadoras de antígeno

Sistema Cerrado

5. **ETAPA E**

TIL recolectados de la Etapa D

Sistema Cerrado

6. **ETAPA F**

Formulación Final y/o Transferencia a una Bolsa de Infusión

(opcionalmente crioconservar)

Figura 2A

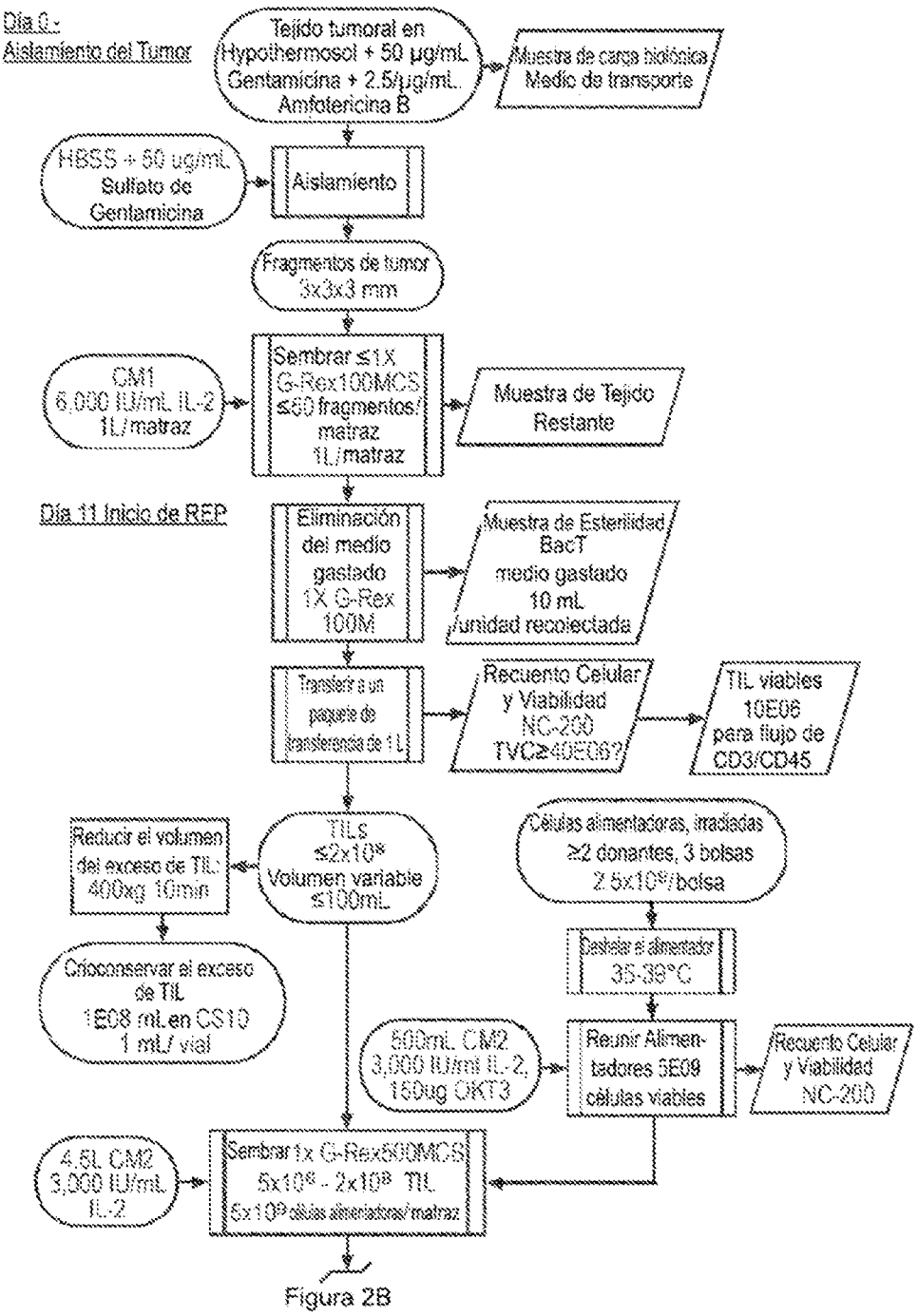


Figura 2B

Figura 2B

Figura 2A

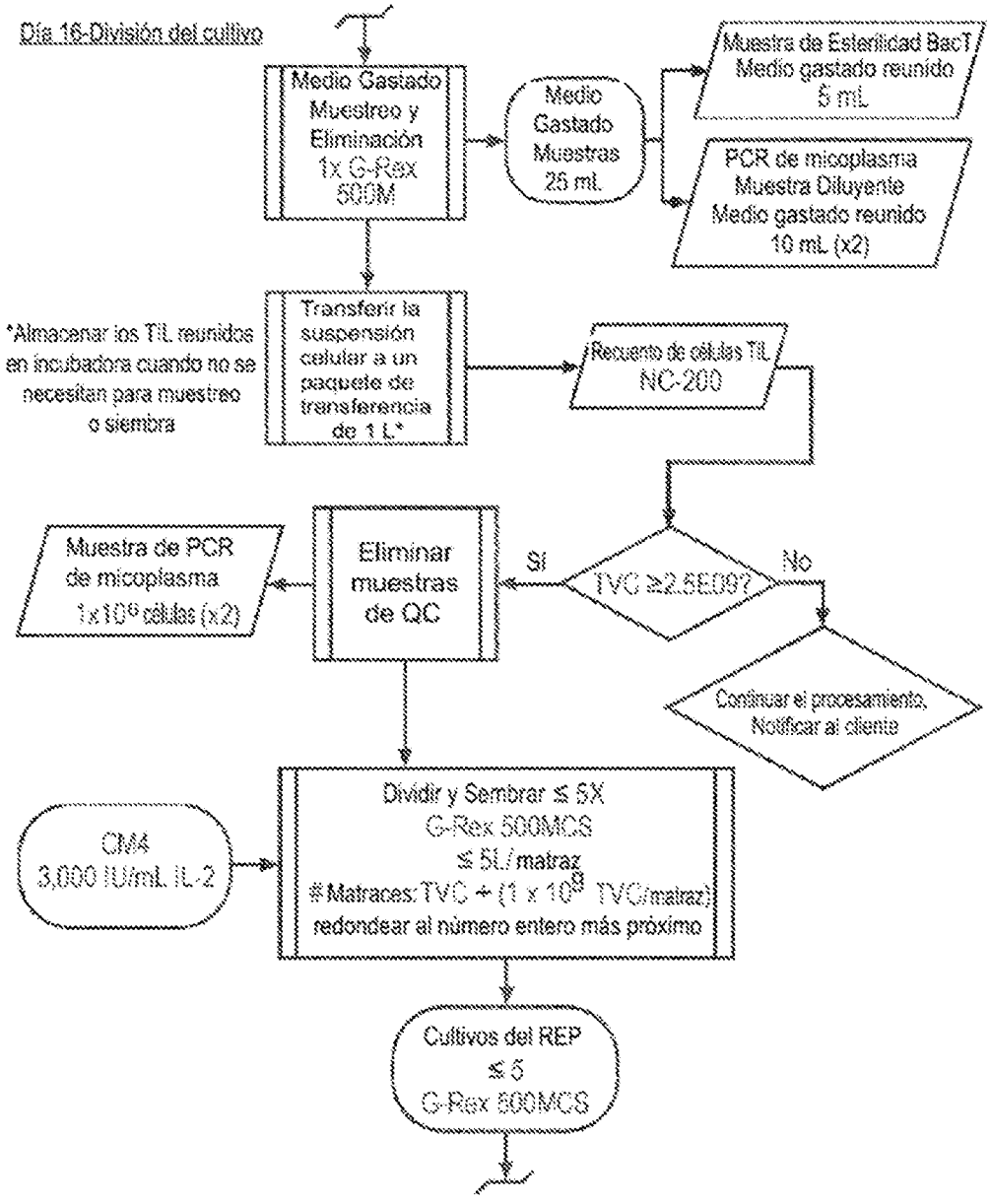
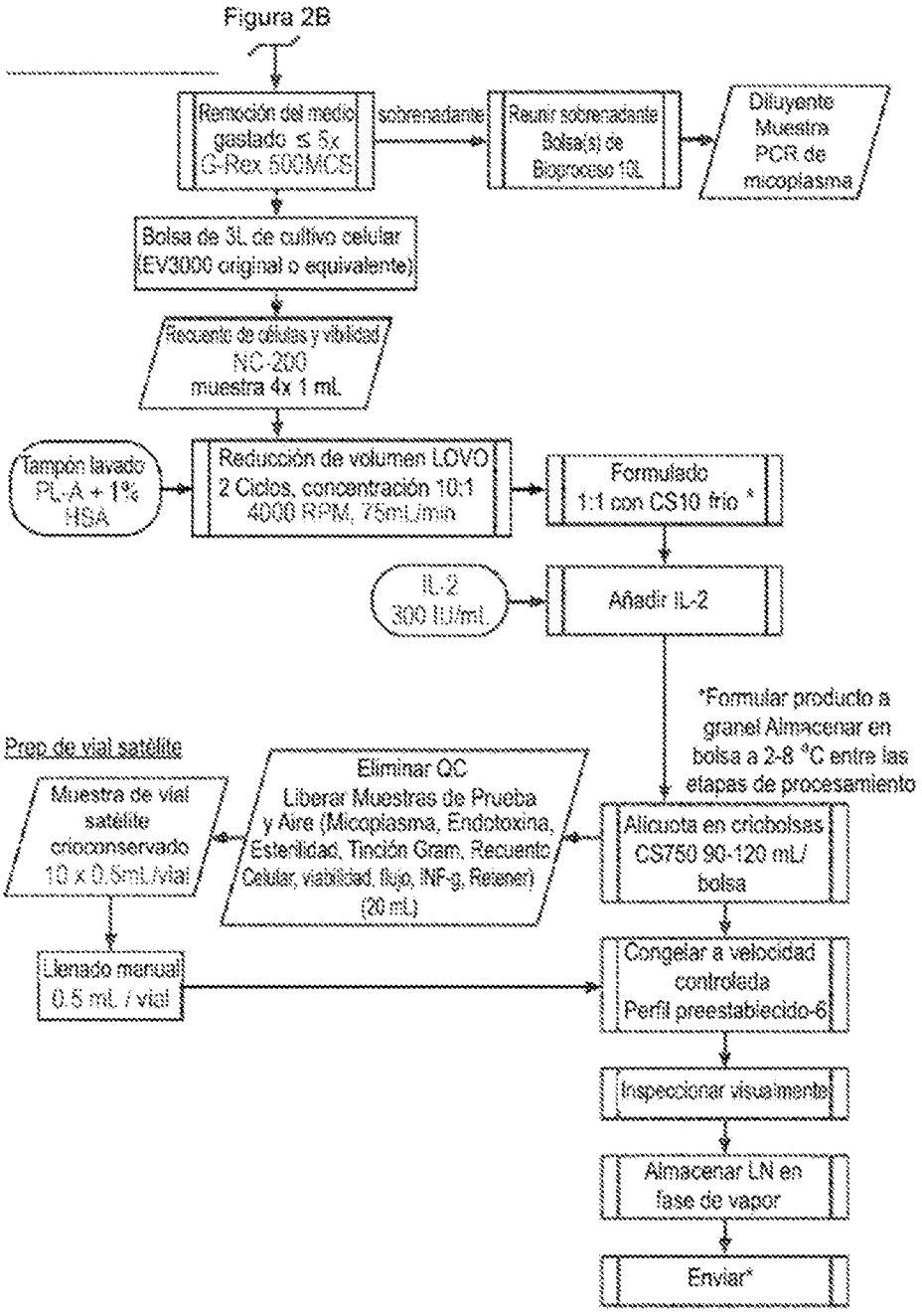


Figura 2C

Figura 2C


Figura 2B
Remoción del medio gastado ≤ 5x G-Rex 500MCS
sobrenadante
Reunir sobrenadante Bolsa(s) de Bioproceso 1L
Diluyente Muestra PCR de micoplasma
Bolsa de 3L de cultivo celular (EV3000 original o equivalente)
Recuento de células y viabilidad NC-200 muestra 4x 1 mL
Tampón lavado PL-A + 1% HSA
Reducción de volumen LOVO 2 Ciclos, concentración 10:1 4000 RPM, 75mL/min
Formulado 1:1 con CS10 frío *
IL-2 300 IU/mL
Añadir IL-2
*Formular producto a granel Almacenar en bolsa a 2-8 °C entre las etapas de procesamiento
Prep de vial satélite
Muestra de vial satélite crioconservado 10 x 0.5mL/vial
Eliminar QC Liberar Muestras de Prueba y Aire (Micoplasma, Endotoxina, Esterilidad, Tinción Gram, Recuento Celular, viabilidad, flujo, INF-g, Reamer) (20 mL)
Alícuota en criobolsas CS750 90-120 mL/ bolsa
Llenado manual 0.5 mL / vial
Congelar a velocidad controlada Perfil preestablecido-6
Inspeccionar visualmente
Almacenar LN en fase de vapor
Enviar*

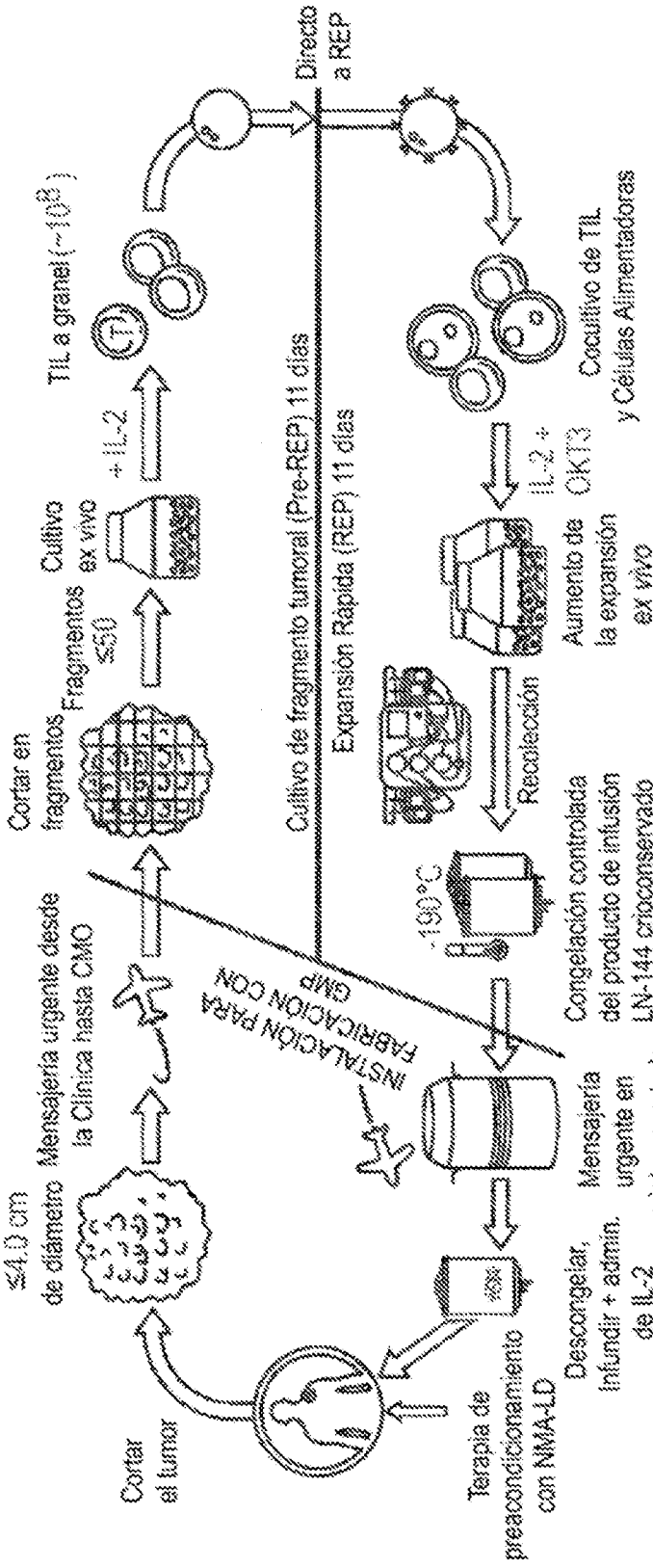

Directo a REP
TIL a granel (~10^9)
+IL-2
Cultivo ex vivo
Fragmentos ≤50
Cortar en fragmentos
Cultivo de fragmento tumoral (Pre-REP) 11 días
Expansión Rápida (REP) 11 días
Cocultivo de TIL y Células Alimentadoras
IL-2 + OKT3
Aumento de la expansión ex vivo
Recolección
-190°C
Congelación controlada del producto de infusión LN-144 criconservado en LN2
INSTALACIÓN PARA FABRICACIÓN CON GMP
Mensajería urgente de criotransportador de CMO a la Clínica
Descongelar, Infundir + admin. de IL-2
Terapia de preacondicionamiento con NMA-LD
Cortar el tumor
≤4.0 cm de diámetro
Mensajería urgente desde la Clínica hasta CMO

Figura 3

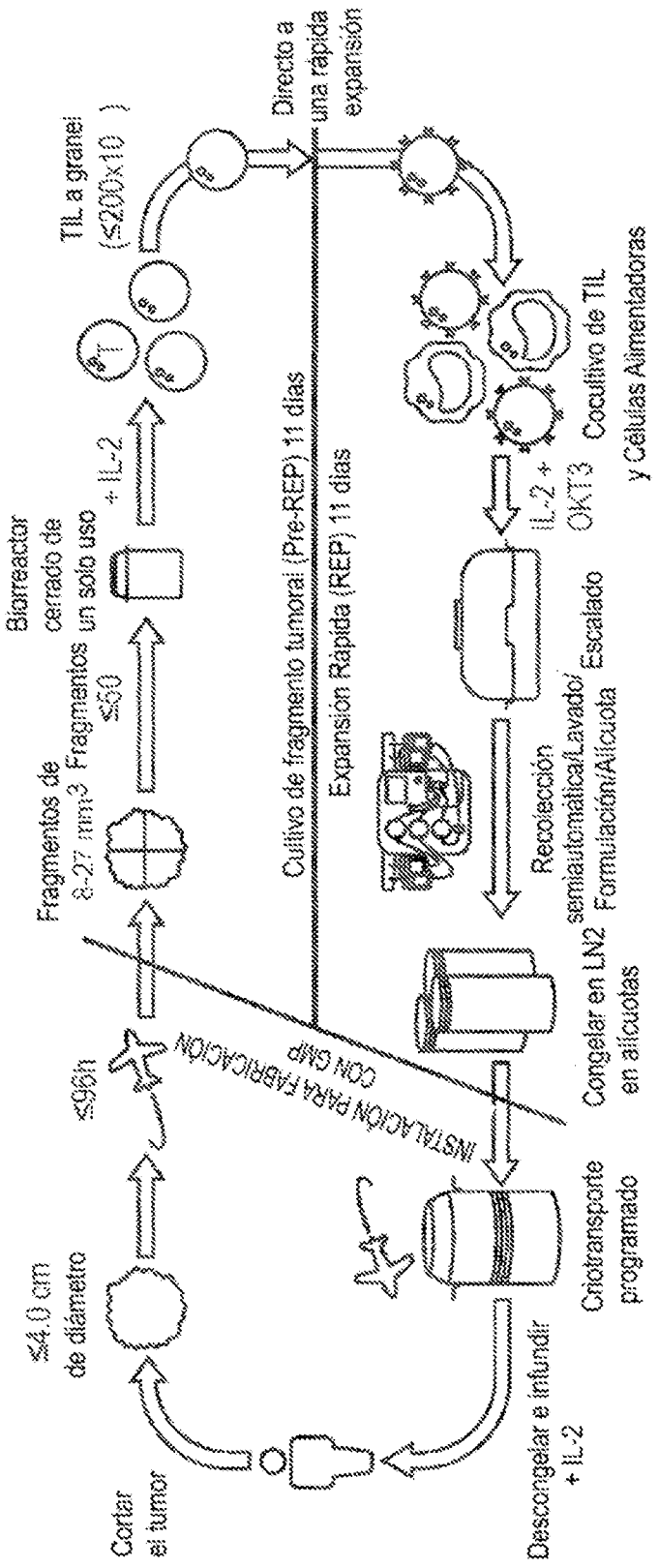

≤4.0 cm de diámetro
Cortar el tumor
≤96h
Fragmentos de 8-27 mm3
Fragmentos ≤50
Biorreactor cerrado de un solo uso
+ IL-2
TIL a granel (≤200x10)
Directo a una rápida expansión
Cultivo de fragmento tumoral (Pre-REP) 11 días
Expansión Rápida (REP) 11 días
Descongelar e infundir + IL-2
Criotransporte programado
Congelar en LN2 en alícuotas
Recolección semiautomática/Lavado/ Formulación/Alícuota
Escalado
IL-2 + OKT3
Cocultivo de TIL y Células Alimentadoras
INSTALACIÓN PARA FABRICACIÓN CON GMP

Figura 4

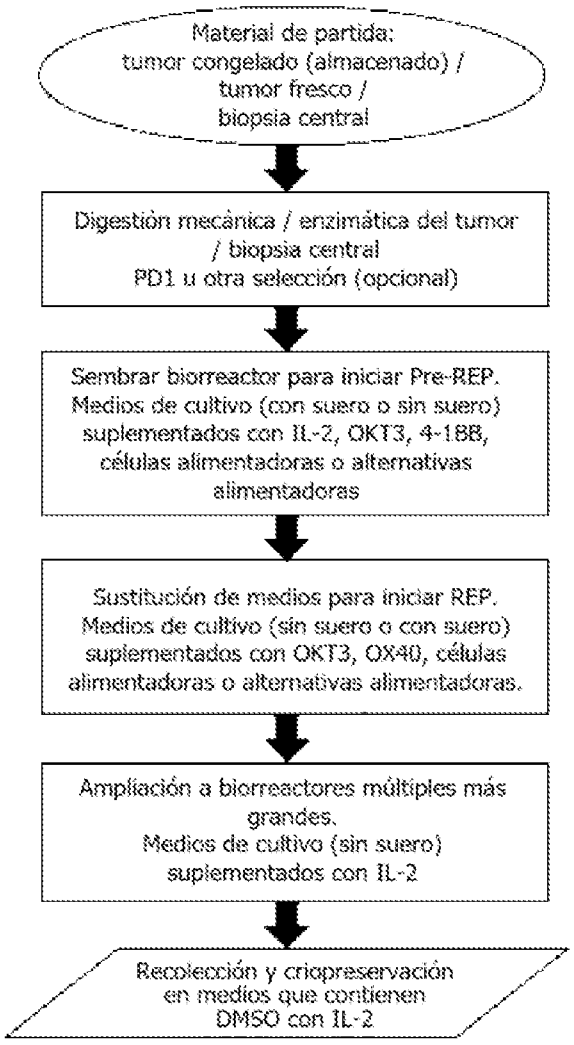
Figura 5

Proceso 1C: 43-55 Días para Etapas A-E	Proceso 2A: aprox. 22 días desde Etapas A-E
1. ETAPA A Obtener Muestra Tumoral del Paciente	**1. ETAPA A** Obtener Muestra Tumoral del Paciente
2. ETAPA B Fragmentación y Primera Expansión 11 días a 21 días	**2. ETAPA B** Fragmentación y Primera Expansión 3 días a 14 días
3. ETAPA C Primera Expansión a Segunda Transición de Expansión Opcionalmente Almacenar hasta Selección	**3. ETAPA C** Primera Expansión a Segunda Transición de Expansión Sin Almacenamiento y Sistema Cerrado
4. ETAPA D Segunda Expansión IL-2, OKT-3, y células alimentadoras presentadoras de antígeno Opcionalmente repetir una o más veces	**4. ETAPA D** Segunda Expansión IL-2, OKT-3, y células alimentadoras presentadoras de antígeno Sistema Cerrado
5. ETAPA E TIL recolectados de la Etapa D	**5. ETAPA E** TIL recolectados de la Etapa D Sistema Cerrado
6. ETAPA F Formulación Final y/o Transferencia a una Bolsa de Infusión	**6. ETAPA F** Formulación Final y/o Transferencia a una Bolsa de Infusión (opcionalmente criopreservar)

Figura 6

Etapa de Proceso	Realización del Proceso 1C	Realización del Proceso 2A	Ventajas
Pre-REP	• 4 fragmentos por 10 matraces GREX-10 • duración 11-21 días	• 40 fragmentos por 1 matraz GREX-100M • duración 11 días	• Más fragmentos tumorales por matraz • Tiempo de cultivo más corto • Número reducido de etapas • Apto para sistema cerrado
Pre-REP a Transición REP	• Los TIL pre-REP se congelan hasta fenotipado por selección luego se descongelan para proceder al REP (~ día 30) • REP requiere >40×10^6 TIL	• Los TIL pre-REP se mueven directamente al REP el día 11 • REP requiere 25-200×10^6 TIL	• Proceso más corto de pre-REP a REP • Menor número de etapas • Se eliminó la selección de fenotipo • Apto para sistema cerrado
REP	• 6 matraces GREX-100M el día 0 del REP • 5×10^6 TIL y 5×10^8 alimentadores de PBMC por matraz el día 0 del REP • Dividir en 18-36 matraces el día 7 del REP • duración 14 días	• 1 matraz GREX-500M el día 11 • 25-200×10^6 TIL y 5x10^8 alimentadores de PBMC el día 11 • Dividir en ≤ 6 matraces GREX-500M el día 16 • duración 11 días	• Menor número de etapas • Menor duración de REP • Transferencia del sistema cerrado de TIL entre matraces • Intercambios de medio de sistema cerrado
Recolección	• TIL recolectados por centrifugación	• TIL recolectados por el sistema automatizado de lavado de células LOVO	• Menor número de etapas • Lavado automatizado de células • Sistema cerrado • Pérdida reducida de producto durante el lavado
Formulación Final	• Producto fresco en Hypothermosol • Bolsa única de infusión • Estabilidad de envío limitada	• Producto criopreservado en Plasmalyte-A + 1% HSA y CS10 almacenado en LN_2 • Alícuotas múltiples • Estabilidad de envío más larga	• Flexibilidad de envío • Programación flexible del paciente • Liberación más oportuna de las pruebas
Tiempo Total Estimado del Proceso	• 43-66 días	• 22 días	• Respuesta más rápida al paciente

Figura 7



Día 0: Prep. tumor / biopsia

Día 0: Inicio Pre-REP

Día 5-8: Inicio REP

Día 9-11: Aumento REP

Día 12 a 16: Recolección

Figura 8A

Proceso 2A: aproximadamente 22 días desde las etapas A-E	**Proceso GEN 3: aproximadamente 14-18 días desde las etapas A-E**
ETAPA A Obtener muestra tumoral del paciente (opcionalmente se puede congelar antes de la etapa B)	**ETAPA A** Obtener muestra tumoral del paciente (opcionalmente se puede congelar antes de la etapa B)
ETAPA B Primera expansión (fragmentación física de al menos 40 fragmentos por recipiente cultivados durante aproximadamente 3 días a 14 días con medios que comprenden IL-2)	**ETAPA B** Primera expansión de cebado (fragmentación física de hasta 60 fragmentos por contenedor cultivado durante aproximadamente 1 día a 7 días con medios que comprenden IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno)
ETAPA C Transición de primera expansión a segunda expansión (Los TIL del Etapa B pasan directamente al Etapa D, opcionalmente el día 11 de la Etapa B)	**ETAPA C** Transición primera expansión de cebado a segunda expansión rápida (Los TIL del Etapa B pasan directamente al Etapa D el día 7)
ETAPA D Segunda expansión (TIL cultivados en medios de crecimiento que comprenden IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno en un recipiente cerrado)	**ETAPA D** Segunda expansión rápida (TIL cultivados en medios de crecimiento que comprenden IL-2, OKT-3 y 2x células alimentadoras presentadoras de antígeno; Días 10-11: escalar y añadir IL-2 adicional)
ETAPA E Recoger TIL de la etapa D (TIL recolectados a través de un sistema cerrado)	**ETAPA E** Recoger TIL de la etapa D
ETAPA F Formulación final y/o transferencia a bolsa de infusión (criopreservar opcionalmente)	**ETAPA F** Formulación final y/o transferencia a bolsa de infusión (criopreservar opcionalmente)

Figura 8B

Proceso GEN 3: aproximadamente 14-18 días desde las etapas A-E

ETAPA A

Obtener muestra tumoral del paciente
(opcionalmente se puede congelar antes de la etapa B)

ETAPA B

Primera expansión de cebado
(fragmentación física de hasta 60 fragmentos por contenedor cultivado durante aproximadamente 1 día a 7 días con medios que comprenden IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno)

ETAPA C

Transición primera expansión de cebado a segunda expansión rápida (Los TIL del Etapa B pasan directamente al Etapa D el día 7)

ETAPA D

Segunda expansión rápida
(TIL cultivados en medios de crecimiento que comprenden IL-2, OKT-3 y 2x células alimentadoras presentadoras de antígeno;
Días 10-11: escalar y añadir IL-2 adicional)

ETAPA E

Recoger TIL de la etapa D

ETAPA F

Formulación final y/o transferencia a bolsa de infusión
(criopreservar opcionalmente)

Figura 8C

Realización GEN 3.0: aproximadamente 14-18 días desde las etapas A-E	Realización GEN 3.1: aproximadamente 14-18 días desde las etapas A-E	Realización GEN 3.1 Ensayo/F: aproximadamente 14-18 días desde las etapas A-E
ETAPA A Obtener muestra tumoral del paciente (opcionalmente se puede congelar antes de la etapa B)	**ETAPA A** Obtener muestra tumoral del paciente (opcionalmente se puede congelar antes de la etapa B)	**ETAPA A** Obtener muestra tumoral del paciente (opcionalmente se puede congelar antes de la etapa B)
ETAPA B Primera expansión (fragmentación física de al menos 40 fragmentos por recipiente cultivados durante aproximadamente 1 día a 7/8 días con medios que comprenden IL-2)	**ETAPA B** Primera expansión de cebado (fragmentación física de hasta 60 fragmentos por contenedor cultivado durante aproximadamente 1 día a 7/8 días con medios que comprenden IL-2, y OKT-3)	**ETAPA B** Primera expansión de cebado (fragmentación física de hasta 60 fragmentos por contenedor cultivado durante aproximadamente 1 día a 7/8 días con medios que comprenden IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno)
ETAPA C Transición primera expansión de cebado a segunda expansión rápida (Los TIL del Etapa B pasan directamente al Etapa D el día 7/8)	**ETAPA C** Transición primera expansión de cebado a segunda expansión rápida (Los TIL del Etapa B pasan directamente al Etapa D el día 7/8)	**ETAPA C** Transición primera expansión de cebado a segunda expansión rápida (Los TIL del Etapa B pasan directamente al Etapa D el día 7/8)
ETAPA D Segunda expansión rápida (TIL cultivados en medios de crecimiento que comprenden IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno; Días 10-11: escalar y añadir IL-2 adicional)	**ETAPA D** Segunda expansión rápida (TIL cultivados en medios de crecimiento que comprenden IL-2, OKT-3 y 2x células alimentadoras presentadoras de antígeno; Días 10-11: escalar y añadir IL-2 adicional)	**ETAPA D** Segunda expansión rápida (TIL cultivados en medios de crecimiento que comprenden IL-2, OKT-3 y 2x células alimentadoras presentadoras de antígeno; Días 10-11: escalar y añadir IL-2 adicional)
ETAPA E Recoger TIL de la etapa D	**ETAPA E** Recoger TIL de la etapa D	**ETAPA E** Recoger TIL de la etapa D
ETAPA F Formulación final y/o transferencia a bolsa de infusión (criopreservar opcionalmente)	**ETAPA F** Formulación final y/o transferencia a bolsa de infusión (criopreservar opcionalmente)	**ETAPA F** Formulación final y/o transferencia a bolsa de infusión (criopreservar opcionalmente)

Figura 9

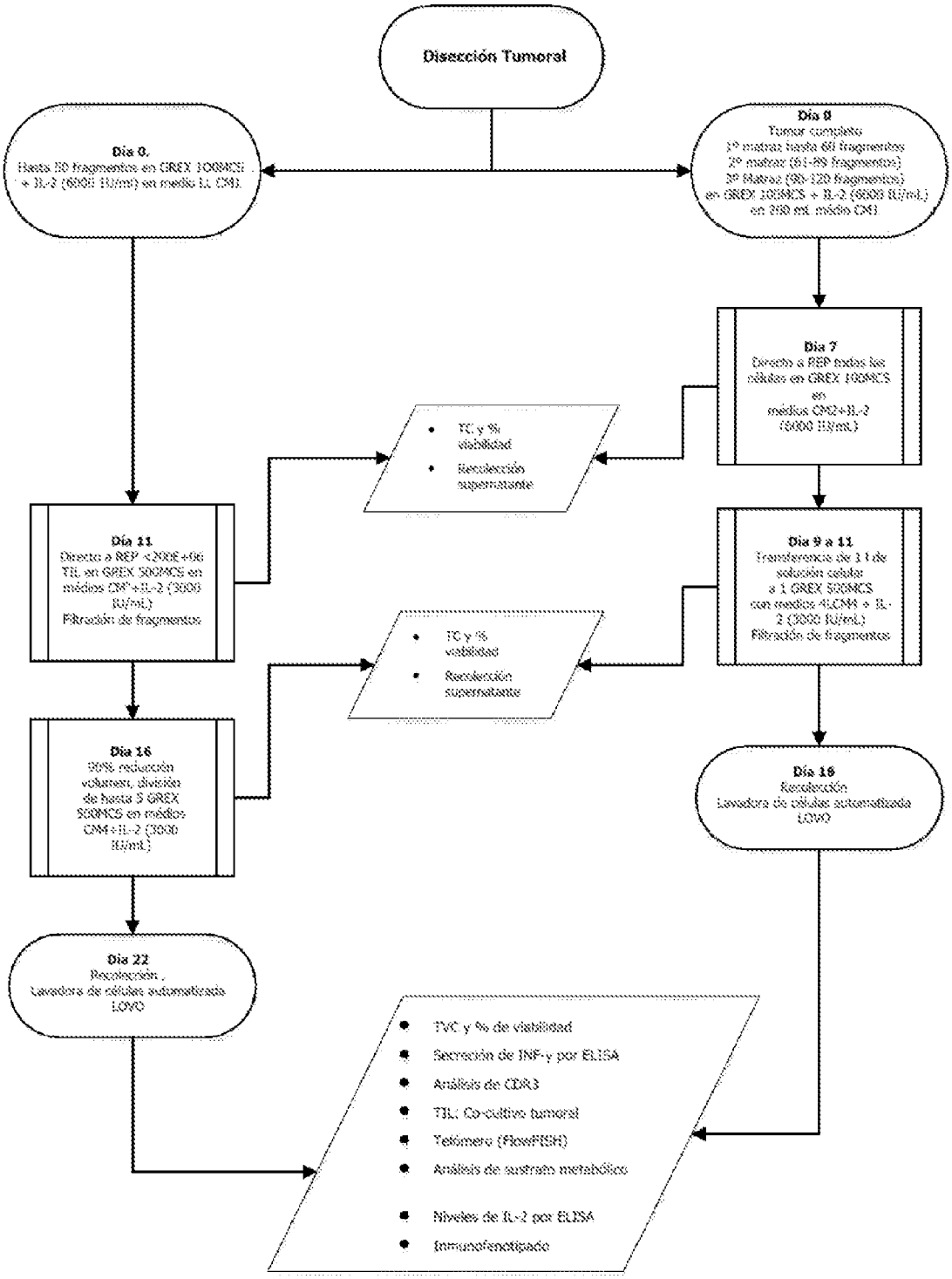
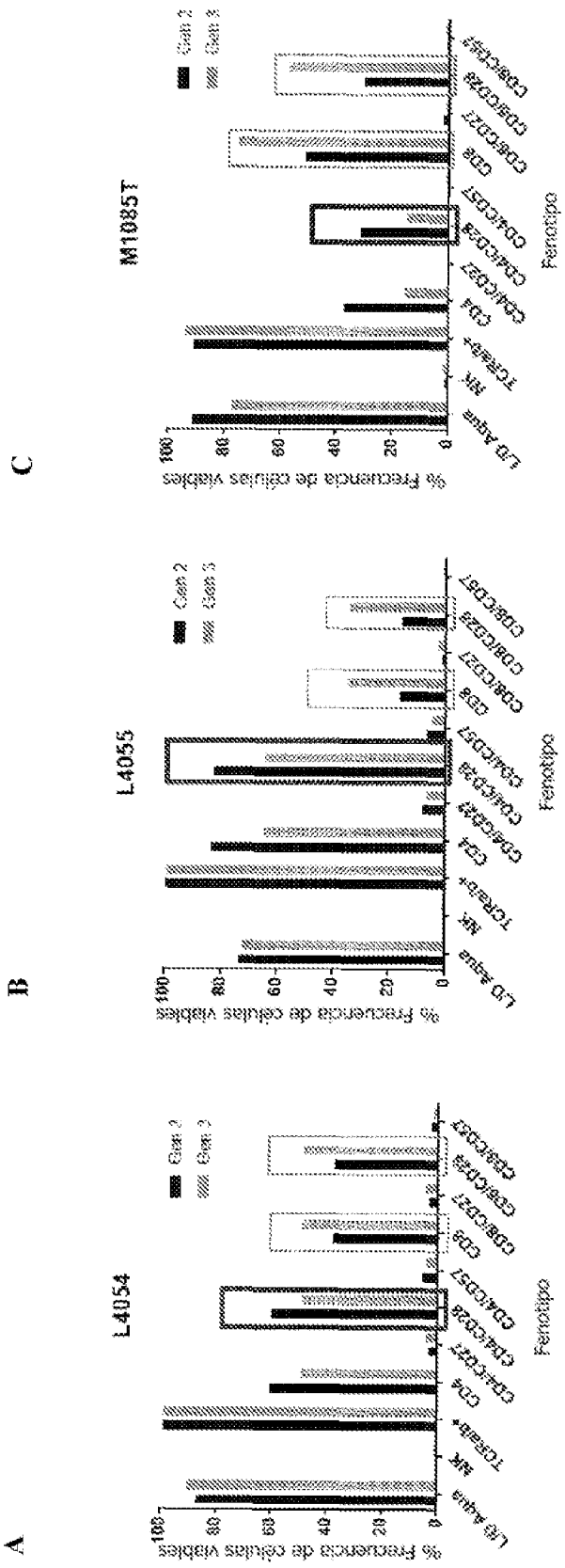

Disección Tumoral
Día 0.
Día 8
Día 7
Día 11
Día 9 a 11
Día 16
Día 18
Día 22
TC y % viabilidad
Recolección supernatante
TC y % viabilidad
Recolección supernatante
TVC y % de viabilidad
Secreción de INF-γ por ELISA
Análisis de CDR3
TIL Co-cultivo tumoral
Telómero (FlowFISH)
Análisis de sustrato metabólico
Niveles de IL-2 por ELISA
Inmunofenotipado

Figura 10



Tumor ID	L4054		L4055		M1085T	
Proceso	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
# Fragmentos	21	21	24	24	16	16

Figura 11

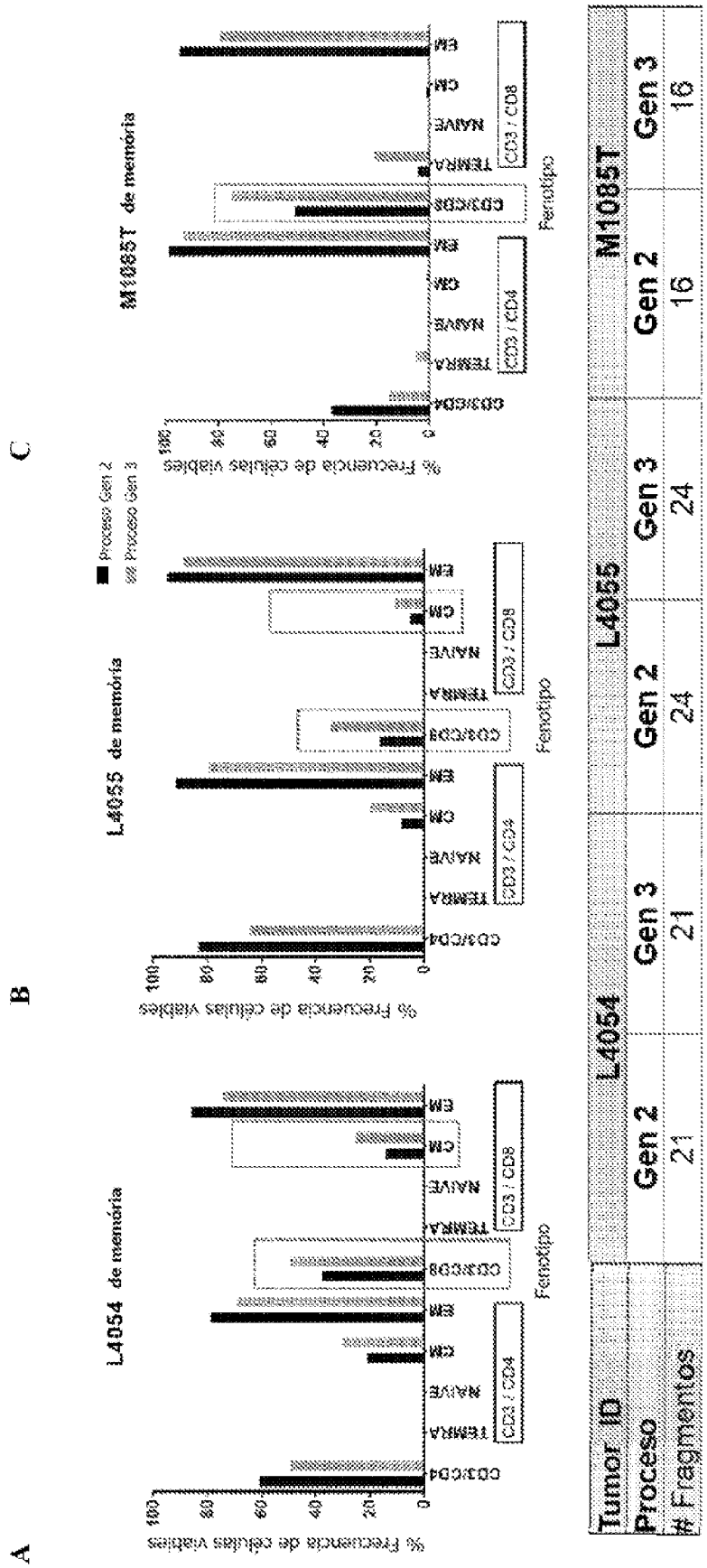

A
B
C
L4054 de memória
L4055 de memória
M1085T de memória
Processo Gen 2
Processo Gen 3
% Frecuencia de células viables
Fenotipo
CD3/CD4
CD3/CD8
TEMRA
NAIVE
CM
EM
Tumor ID
Proceso
Fragmentos
L4054
L4055
M1085T
Gen 2
Gen 3
21
21
24
24
16
16

Figura 12

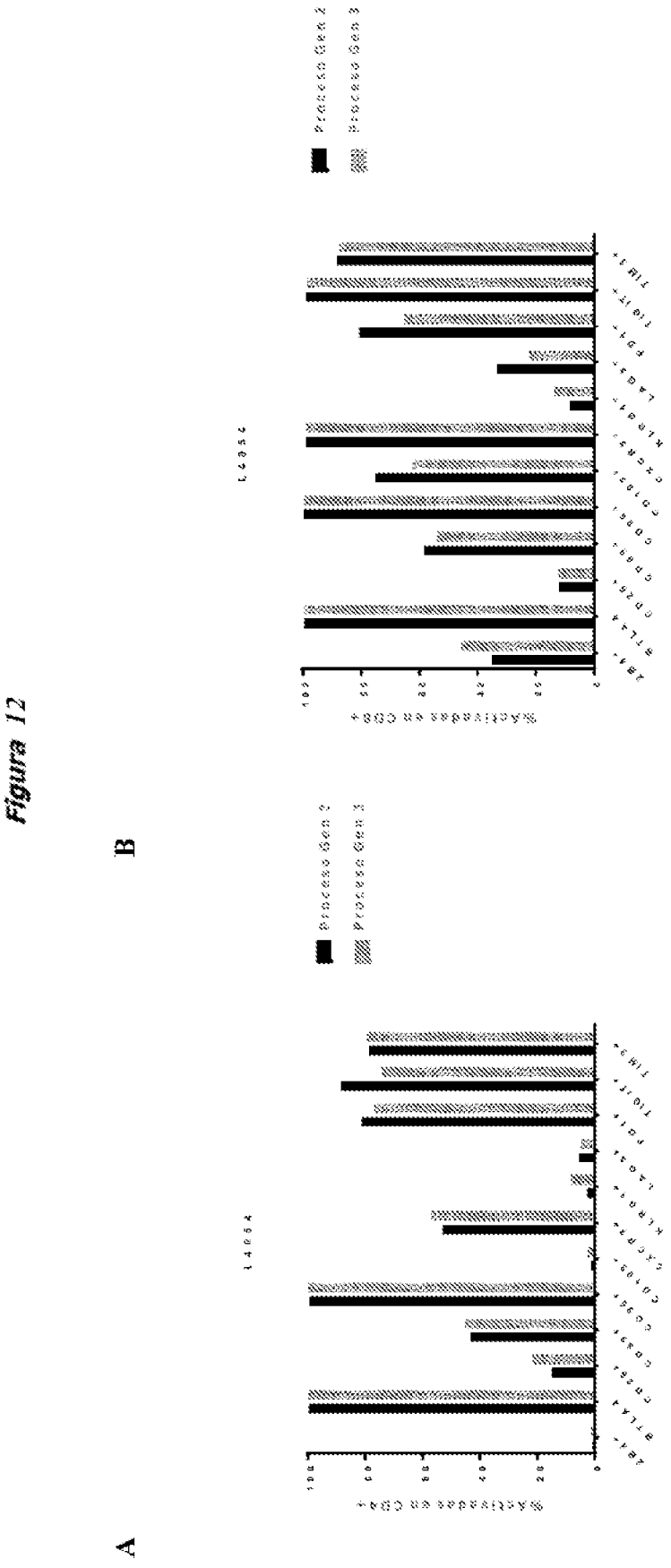

A
B
Process Gen 2
Process Gen 3
% Activadas en CD8+
% Activadas en CD8+
Process Gen 2
Process Gen 3

Figura 13

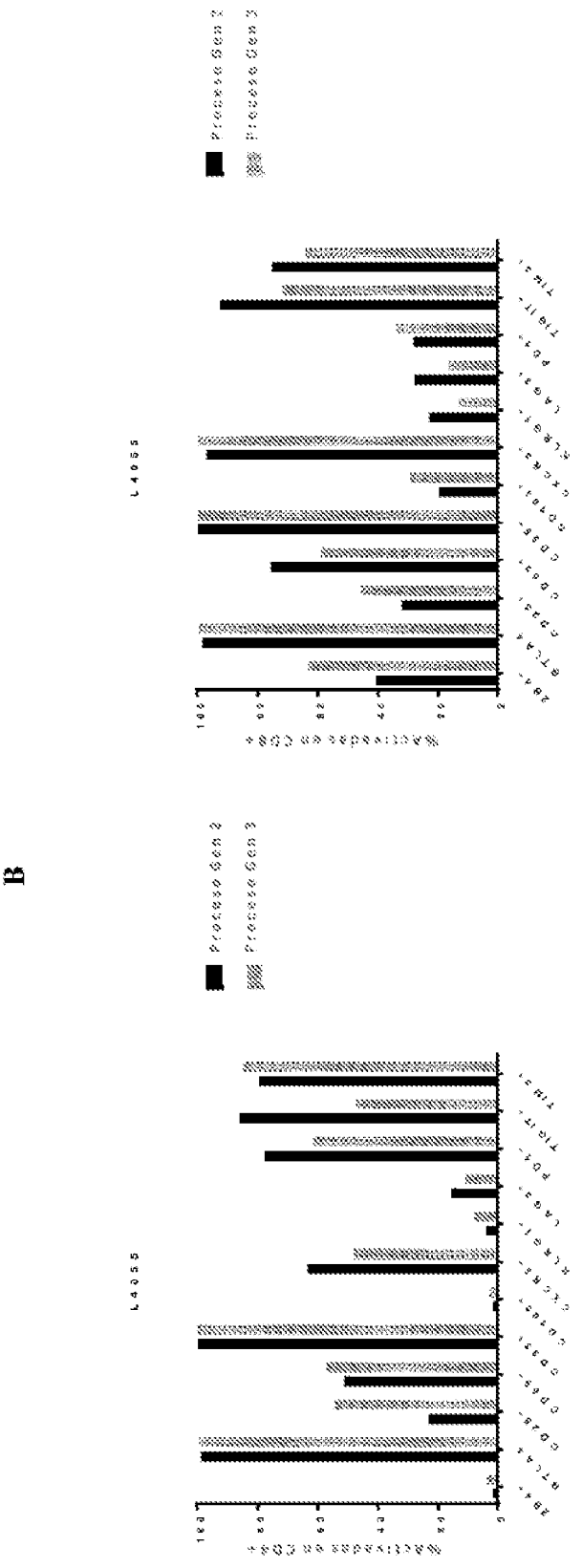

A
B
L4055
Process Gen 2
Process Gen 3
% Activadas en CD8+
28A-
BTLA+
CD28-
CD95+
CD27-
CD122+
KLRG1-
LAG3+
PD1+
TIGIT-
TIM3+

Figura 14

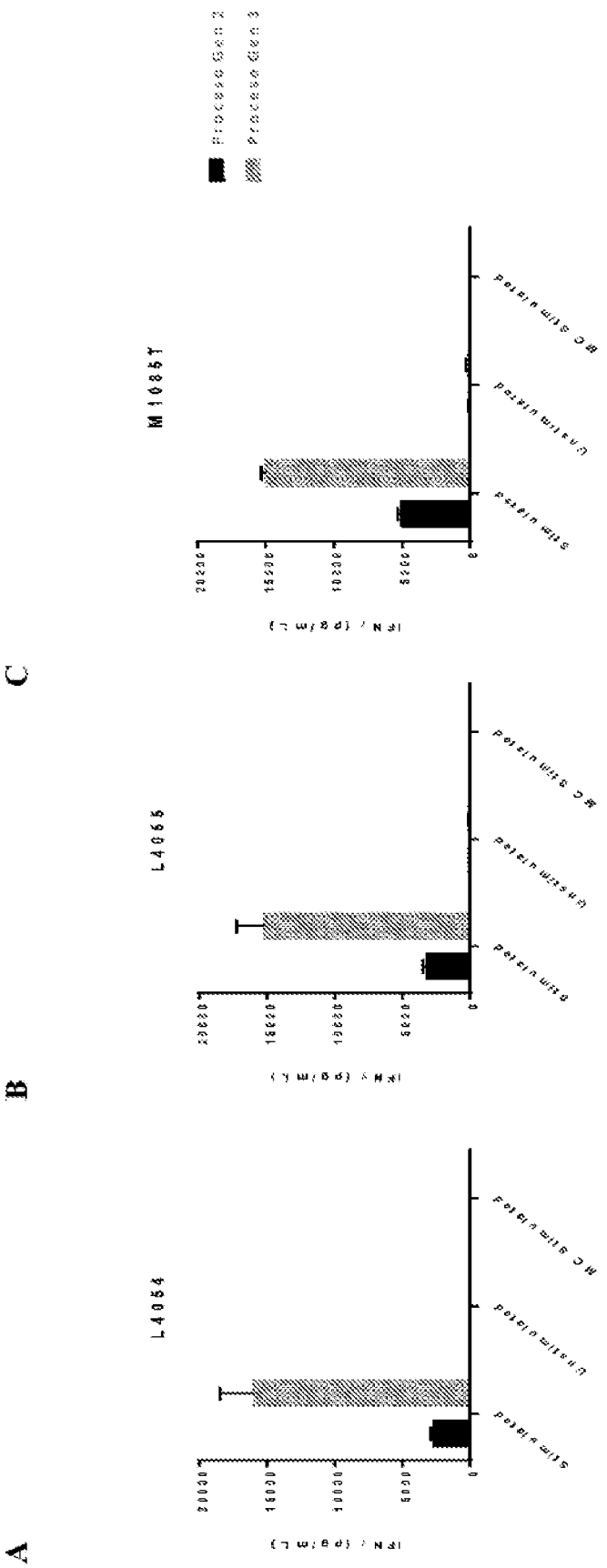

A
B
C
L4054
L4065
M10851
IFN γ (pg/mL)
Estímulo
Patrón
Patrón + estímulo
Estímulo + patrón

Figura 15

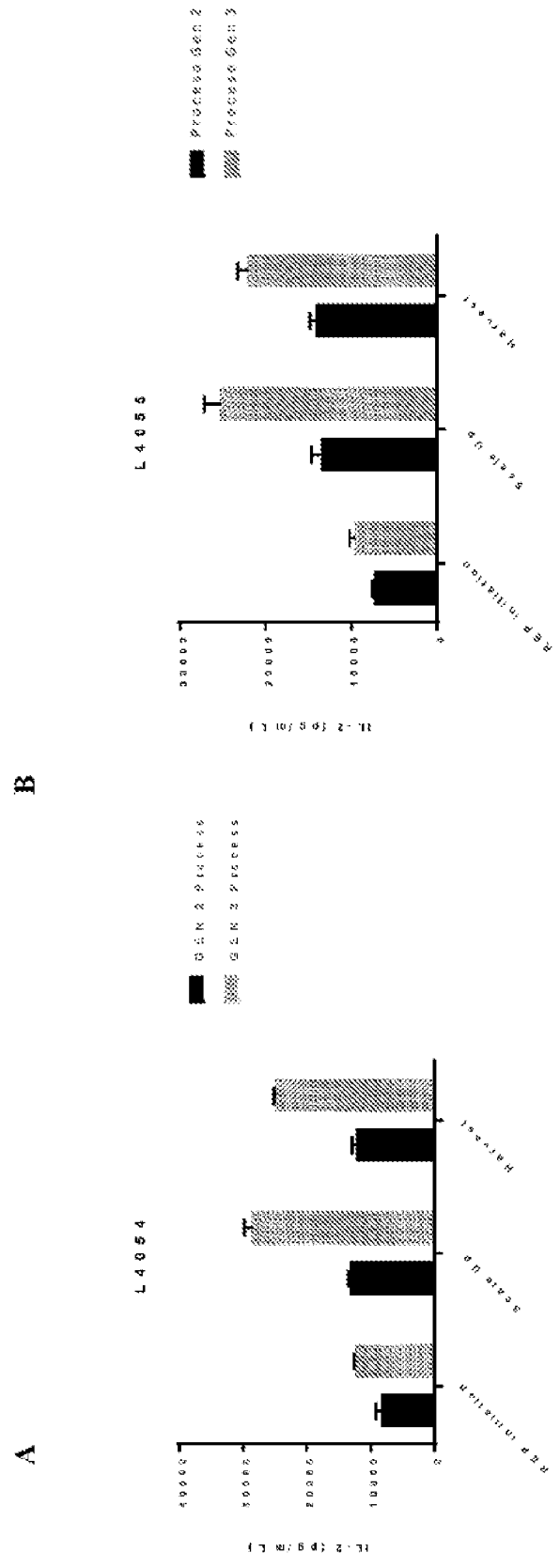

A
B
L4054
L4055
GEN 2 Process
GEN 3 Process
RSP Initiation
Scale Up
Harvest
IL-2 (pg/mL)

Figura 16

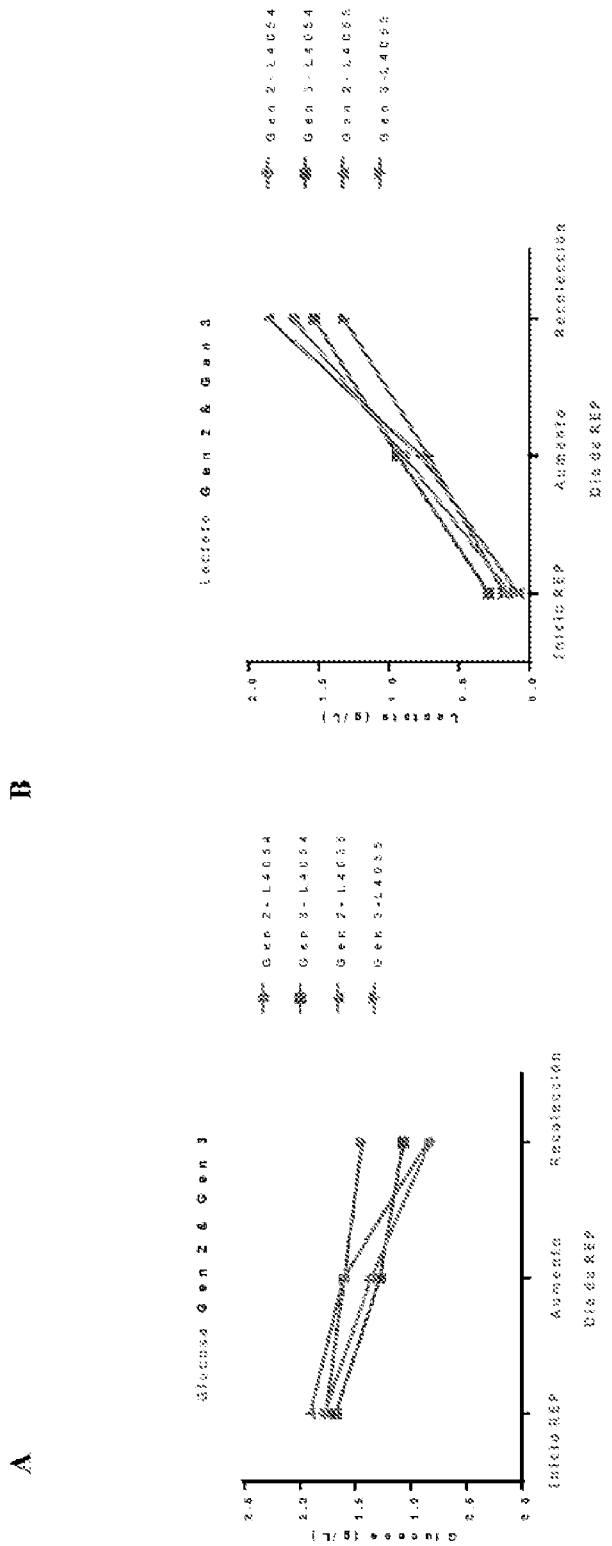
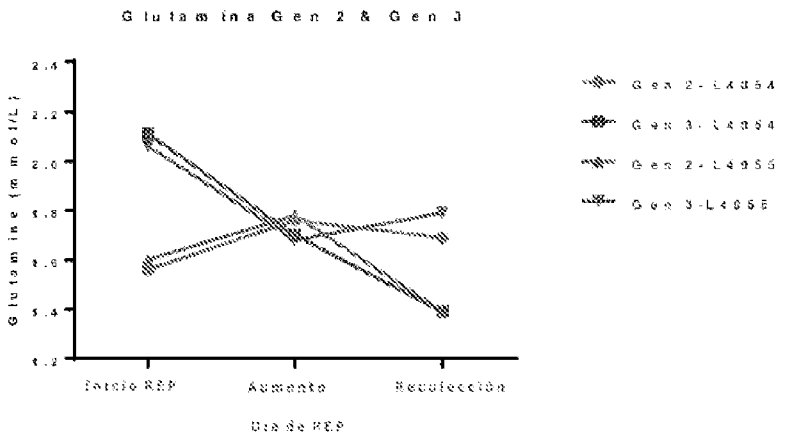

A
B
Gen 2 - L4054
Gen 3 - L4054
Gen 2 - L4055
Gen 3 - L4055
Inicio REP
Aumento
Reabsorción
Día de REP

Figura 17

A


Glutamina Gen 2 & Gen 3
Glutamine (mmol/L)
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
Inicio PEP
Aumento
Reclutación
Dia de PEP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

B

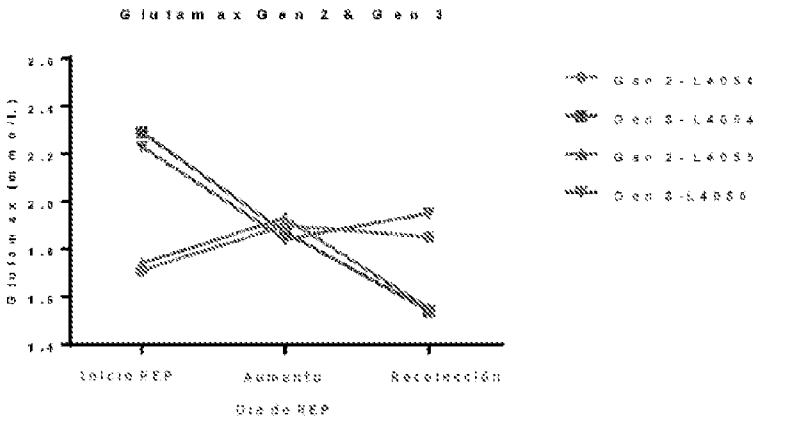

Glutamax Gen 2 & Gen 3
Glutamax (mmol/L)
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
Inicio PEP
Aumento
Reclutación
Dia de PEP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

Figura 17

C

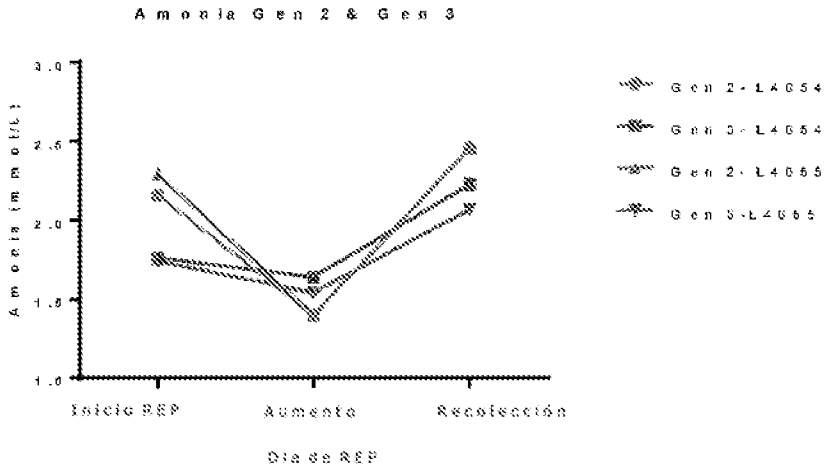

Amonio Gen 2 & Gen 3
Amonio (mmol/L)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
Inicio REP
Aumento
Recolección
Día de REP
Gen 2 - L4054
Gen 3 - L4054
Gen 2 - L4055
Gen 3 - L4055

Figura 18

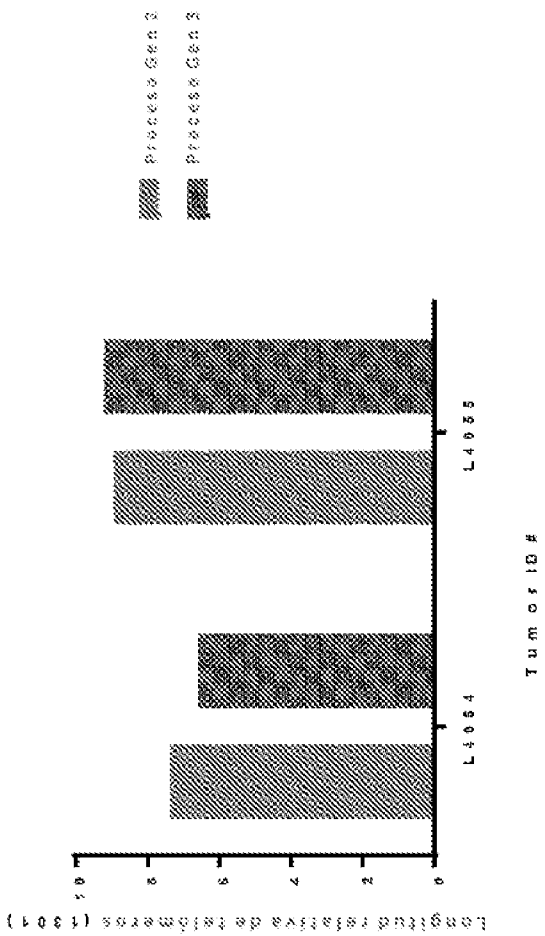

Process Gen 3
Process Gen 3
L4055
L4064
Tumor ID #
Longitud relativa de tallómeros (1301)
0
2
4
6
8
10

Figura 19

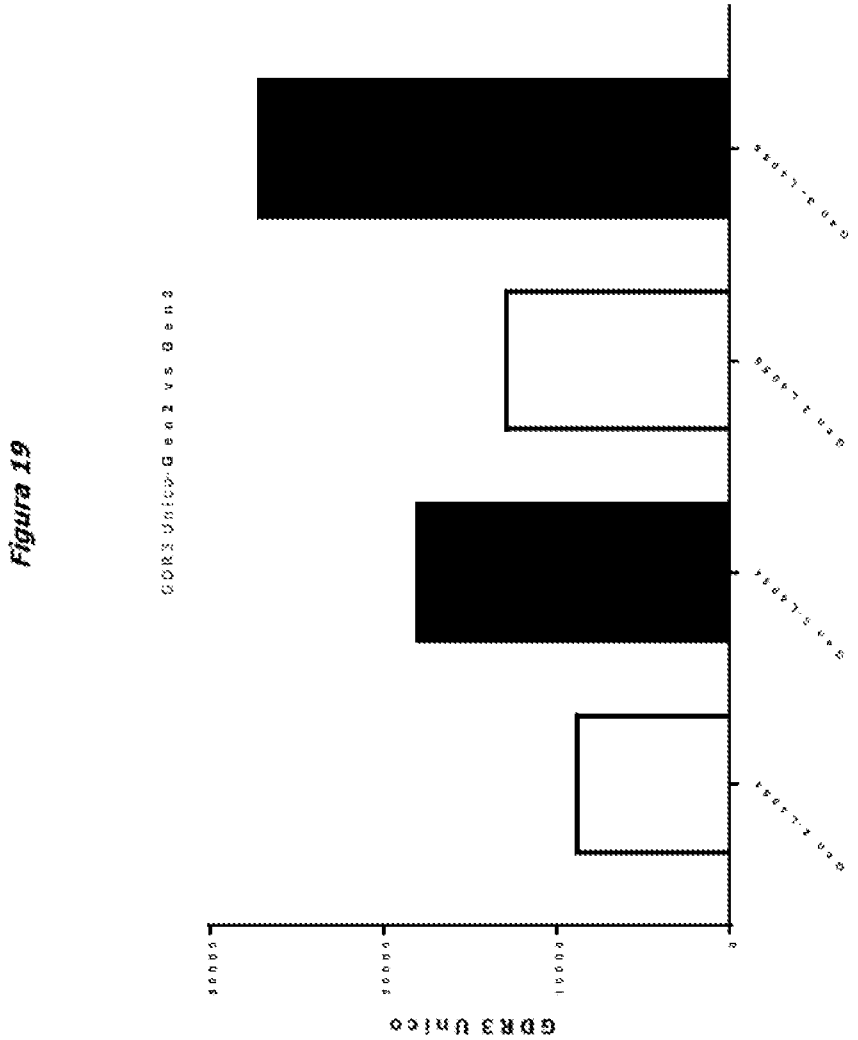


Figura 20

# uCDR3 (% de solapamiento)	Todas las uCDR3		Top 80% de uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

* 199 secuencias se comparten entre el producto final Gen 3 y Gen 2, lo que corresponde al 97,07% del top 80% de secuencias CDR3 únicas de Gen 2 compartidas con el producto final Gen 3.

Figura 21

Frecuencia de uCDR3

# uCDR3 de solapamiento)	Todas las uCDR3		Top 80% de uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-14055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-14055	-	27246	-	2616

* 1833 secuencias se comparten entre el producto final Gen 3 y Gen 2, lo que corresponde al 99,45% del top 80% de secuencias CDR3 únicas de Gen 2 compartidas con el producto final Gen 3.

Figura 22

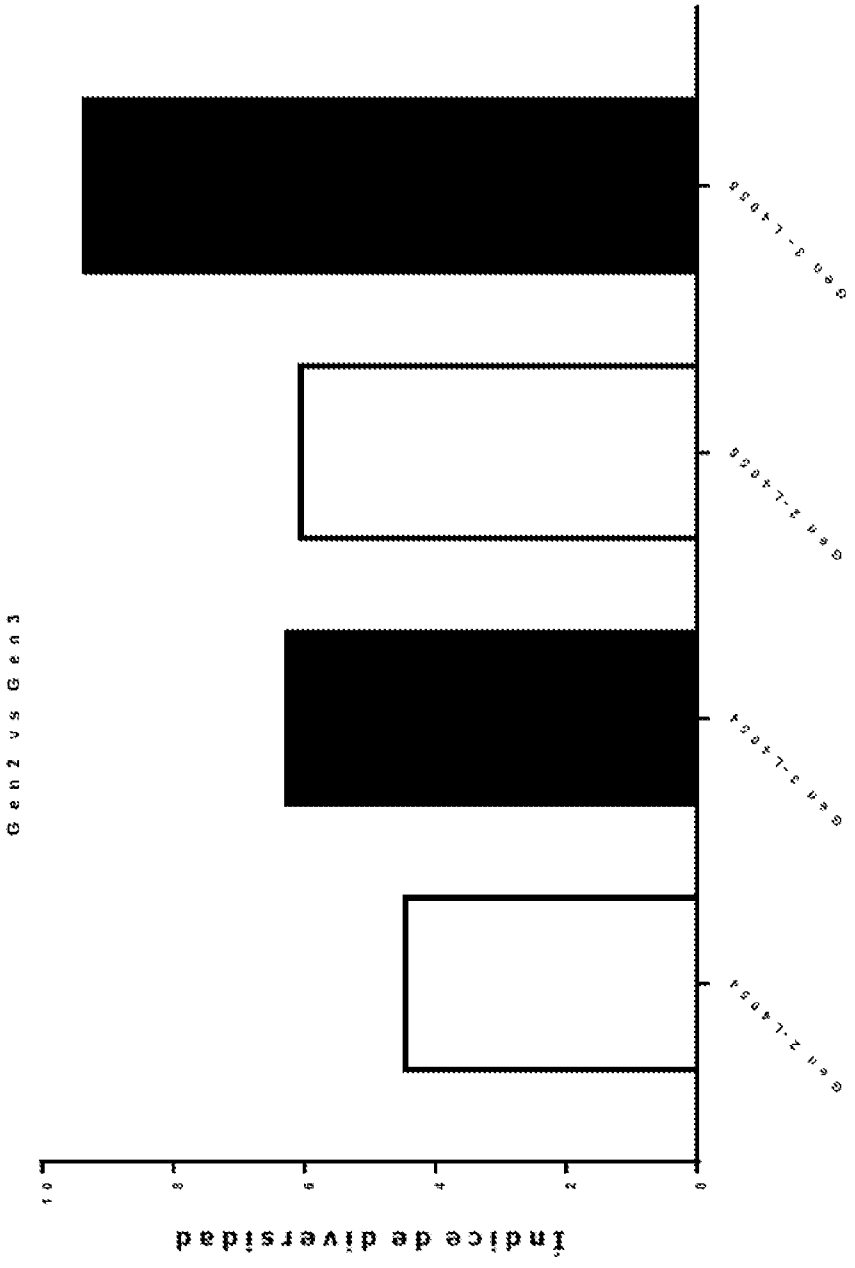

Gen2 vs Gen3
índice de diversidad
10
8
6
4
2
0
Gen 2-L405A
Gen 2-L405B
Gen 3-L405A
Gen 3-L405B

Figura 23

Recuento de células Día 7 Inicio de la generación 3 de REP

Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio (células/mL)	Células totales Volumen promedio
188	Total	2.46E+05	2.28E+05	2.31E+05	2.35E+05	4.42E+07
	Vivas	2.37E+05	2.27E+05	2.26E+05	2.30E+05	4.32E+07
	Muertas	9.26E+03	7.03E+02	4.63E+03	4.86E+03	9.14E+05
	% Viabilidad	96.20%	99.70%	98.00%	97.97%	
188	Total	8.26E+04	8.00E+04	7.66E+04	7.97E+04	1.50E+07
	Vivas	7.60E+04	7.54E+04	6.89E+04	7.34E+04	1.38E+07
	Muertas	6.61E+03	4.63E+03	7.73E+03	6.32E+03	1.19E+06
	% Viabilidad	92.00%	94.20%	89.90%	92.03%	
200	Total	2.44E+04	4.20E+04	1.05E+04	2.56E+04	5.13E+06
	Vivas	1.74E+04	2.80E+04	7.03E+03	1.75E+04	3.50E+06
	Muertas	7.03E+03	1.40E+04	3.48E+03	8.17E+03	1.63E+06
	% Viabilidad	71.20%	66.70%	66.90%	68.27%	

Figura 24

Recuentos de células Día 11 - inicio REP de Gen 2 y aumento de Gen 3

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio (células/mL	Células totales Volumen promedio
Gen 3 #L4054 Primera ronda	1000	Total	9.11E+05	1.01E+06	1.08E+06	1.00E+06	1.00E+09
		Vivas	8.60E+05	9.34E+05	1.01E+06	9.35E+05	9.35E+08
		Muertas	5.09E+04	7.49E+04	6.74E+04	6.44E+04	6.44E+07
		% Viabilidad	94.40%	92.60%	93.70%	93.57%	
Gen 3 #L4055 Segunda ronda	1000	Total	8.56E+05	9.04E+05	8.81E+05	8.80E+05	8.80E+08
		Vivas	8.24E+05	8.67E+05	8.42E+05	8.44E+05	8.44E+08
		Muertas	3.17E+04	3.70E+04	3.87E+04	3.58E+04	3.58E+07
		% Viabilidad	96.30%	95.90%	95.60%	95.93%	
Gen 3 #M1085T	200	Total	2.32E+06	2.25E+06		2.29E+06	4.57E+08
		Vivas	1.68E+06	1.57E+06		1.63E+06	3.25E+08
		Muertas	6.41E+05	6.79E+05		6.60E+05	1.32E+08
		% Viabilidad	72.40%	69.90%		71.15%	
Gen 2 #L4054 Primera ronda	142	Total	1.08E+06	9.84E+05	1.00E+06	1.02E+06	1.45E+08
		Vivas	1.06E+06	9.71E+05	9.79E+05	1.00E+06	1.42E+08
		Muertas	2.05E+04	1.26E+04	2.12E+04	1.81E+04	2.57E+06
		% Viabilidad	98.10%	98.70%	97.90%	98.23%	
Gen 2 #L4055 Segunda ronda	96	Total	2.93E+05	3.05E+05	2.64E+05	2.87E+05	2.76E+07
		Vivas	2.88E+05	2.96E+05	2.55E+05	2.80E+05	2.68E+07
		Muertas	4.72E+03	9.14E+03	8.26E+03	7.37E+03	7.08E+05
		% Viabilidad	98.40%	97.00%	96.90%	97.43%	
Gen 2 #M1085T	200	Total	9.10E+04	5.60E+04		7.35E+04	1.47E+07
		Vivas	8.05E+04	4.21E+04		6.13E+04	1.23E+07
		Muertas	1.04E+04	1.39E+04		1.22E+04	2.43E+06
		% Viabilidad	88.50%	75.20%		81.85%	

Figura 25

Recuentos de células Día 16 - Aumento de Gen 2 y Recolección de Gen 3

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio células/mL	Células totales Volumen promedio
Gen 3 #L4054 Primera ronda-pre LOVO	1243.1	Total	1.40E+07	1.45E+07		1.43E+07	1.78E+10
		Vivas	1.32E+07	1.35E+07		1.34E+07	1.66E+10
		Muertas	8.47E+05	1.12E+06		9.83E+05	1.22E+09
		% Viabilidad	94.00%	92.40%		93.20%	
Gen 3 #L4054 Primera ronda-post LOVO	330	Total	6.35E+07	6.07E+07		6.21E+07	2.05E+10
		Vivas	5.72E+07	5.44E+07		5.58E+07	1.84E+10
		Muertas	6.35E+06	6.27E+06		6.31E+06	2.08E+09
		% Viabilidad	90.00%	89.70%		89.85%	

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio células/mL	Células totales Volumen promedio
Gen 3 #L4055 Segunda ronda-pre LOVO	1032.6	Total	9.49E+06	1.05E+07		1.00E+07	1.03E+10
		Vivas	8.90E+06	9.79E+06		9.35E+06	9.65E+09
		Muertas	5.85E+05	6.75E+05		6.30E+05	6.51E+08
		% Viabilidad	93.80%	93.60%		93.70%	
Gen 3 #L4055 Segunda ronda-post LOVO	330	Total	3.31E+07	2.82E+07	3.18E+07	3.07E+07	1.01E+10
		Vivas	2.85E+07	2.45E+07	2.77E+07	2.66E+07	8.76E+09
		Muertas	4.56E+06	3.61E+06	4.32E+06	4.09E+06	1.35E+09
		% Viabilidad	86.20%	87.20%	87.10%	86.70%	

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio células/mL	Células totales Volumen promedio
Gen 3 #M1085T pre-LOVO	5000	Total	2.26E+06	2.64E+06		2.45E+06	1.23E+10
		Vivas	1.97E+06	2.31E+06		2.14E+06	1.07E+10
		Muertas	2.85E+05	3.30E+05		3.08E+05	1.54E+09
		% Viabilidad	87.40%	87.50%		87.45%	
Gen 3 #M1085T - post LOVO pre adición CS10	150	Total	6.27E+07	5.44E+07		5.86E+07	8.78E+09
		Vivas	5.50E+07	4.74E+07		5.12E+07	7.68E+09
		Muertas	7.70E+06	6.96E+06		7.33E+06	1.10E+09
		% Viabilidad	87.70%	87.20%		87.45%	

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio células/mL	Células totales Volumen promedio
Gen 2 #L4054 Primera ronda	913	Total	3.53E+06	4.30E+06		3.92E+06	3.57E+09
		Vivas	3.35E+06	4.00E+06		3.68E+06	3.36E+09
		Muertas	1.75E+05	3.03E+05		2.39E+05	2.18E+08
		% Viabilidad	95.00%	93.00%		94.00%	
Gen 2 #L4055 Segunda ronda	292	Total	1.29E+07	1.36E+07		1.33E+07	3.87E+09
		Vivas	1.16E+07	1.23E+07		1.20E+07	3.49E+09
		Muertas	1.27E+06	1.23E+06		1.25E+06	3.65E+08
		% Viabilidad	90.10%	90.90%		90.50%	
Gen 2 #M1085T	369	Total	6.75E+06	6.98E+06		6.87E+06	2.53E+09
		Vivas	5.22E+06	5.58E+06		5.40E+06	1.99E+09
		Muertas	1.54E+06	1.40E+06		1.47E+06	5.42E+08
		% Viabilidad	77.20%	79.90%		78.55%	

Figura 26

Recuento de células Día 22 - Recolección Gen 2

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio (células/mL)	Células totales Volumen promedio
Gen 2 #L4054 Primera ronda-pre LOVO	1385.7	Total	3.55E+07	4.12E+07	4.03E+07	3.90E+07	5.40E+10
		Vivas	3.26E+07	3.73E+07	3.67E+07	3.55E+07	4.92E+10
		Muertas	2.93E+06	3.87E+06	3.59E+06	3.46E+06	4.80E+09
		% Viabilidad	91.70%	90.60%	91.10%	91.13%	
Gen 2 #L4054 Primera ronda-pre LOVO	330	Total	1.70E+08	1.79E+08	1.68E+08	1.72E+08	5.69E+10
		Vivas	1.49E+08	1.58E+08	1.48E+08	1.52E+08	5.01E+10
		Muertas	2.16E+07	2.04E+07	2.00E+07	2.07E+07	6.82E+09
		% Viabilidad	87.30%	88.60%	88.10%	87.95%	

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio (células/mL)	Células totales Volumen promedio
Gen 2 #L4055 Primera ronda-pre LOVO	1968.2	Total	3.15E+07	2.51E+07	2.97E+07	2.88E+07	5.66E+10
		Vivas	2.89E+07	2.25E+07	2.72E+07	2.62E+07	5.16E+10
		Muertas	2.57E+06	2.61E+06	2.52E+06	2.57E+06	5.05E+09
		% Viabilidad	91.80%	89.60%	91.50%	90.97%	
Gen 2 #L4055 Primera ronda-pre LOVO	330	Total	2.33E+08	1.89E+08	1.53E+08	1.92E+08	6.33E+10
		Vivas	2.03E+08	1.66E+08	1.33E+08	1.67E+08	5.52E+10
		Muertas	3.00E+07	2.24E+07	1.94E+07	2.39E+07	7.90E+09
		% Viabilidad	87.10%	88.10%	87.30%	87.50%	

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio (células/mL)	Células totales Volumen promedio
Gen 2 #M1085T-pre LOVO	N/A	Total				#DIV/0!	#DIV/0!
		Vivas				#DIV/0!	#DIV/0!
		Muertas				#DIV/0!	#DIV/0!
		% Viabilidad				#DIV/0!	
Gen 2 #M1085T - post LOVO pre adición CS10	150	Total	8.51E+07	9.05E+07		8.78E+07	1.32E+10
		Vivas	7.33E+07	7.79E+07		7.56E+07	1.13E+10
		Muertas	1.18E+07	1.26E+07		1.22E+07	1.83E+09
		% Viabilidad	86.10%	86.10%		86.10%	

Para L4054 Gen 2, el recuento posterior a LOVO se extrapoló a 4 frascos, porque ese era el número total del estudio. 1 frasco fue contaminado, y la extrapolación se hizo para un total = 6,67E+10.

Figura 27

Figura 28


CD3/CD4
CD38
HLA-DR
CCR7-CD45RA+
CCR7+CD45RA+
CCR7+ CD45RA-
CCR7-CD45RA-
GEN 3- 006 16- Recidiva
42.4
95.2
4.96
0.7
1.22
93.1
GEN 2- D22- Recidiva
50.4
98
0.61
0.13
0.3
99
CD3
CD8
CD3/CD8
CD38
HLA-DR
CCR7-CD45RA+
CCR7+CD45RA+
CCR7+CD45RA-
CCR7-CD45RA-
77.6
90.3
30.5
0.013
0.06
79.5
54.3
88
83.2
4.24
0.026
1.05
94.7

Figura 29

									CD4																
	CD8+	CD4+	2B4+	BTLA+		CD103+		CD25+		CD69+		CD95+		CXCR3+		KLRG1+		LAG3+		PD1+		TIGIT+		TIM3+	
Gen 2-L4054				0.61		99.50		1.05		14.80		43.20		99.40		92.80		2.65		5.36		81.20		88.40	
Gen 3-L4054				1.11		99.50		2.28		21.70		45.40		99.70		96.80		8.06		5.97		76.70		74.10	
Gen 2-L4055				1.61		98.50		1.56		28.10		51.10		99.80		63.30		3.86		15.30		77.60		86.00	
Gen 3- L4055				3.57		99.30		2.61		54.40		57.00		99.90		48.00		8.02		10.80		61.40		47.50	
									CD8																
	CD8+	2B4+	BTLA4+		CD103+		CD25+		CD69+		CXCR3+		KLRG1+		LAG3+		PD1+		TIGIT+		TIM3+			
Gen 2-L4054			35.20		99.50		74.80		11.80		58.30		99.10		8.03		33.10		86.80		96.10		88.30	
Gen 3-L4054			45.50		99.50		82.40		12.10		54.00		99.30		13.40		22.10		64.90		96.50		87.50	
Gen 2-L4055			40.60		96.20		19.50		32.00		75.50		99.80		22.80		27.40		28.10		92.30		75.10	
Gen 3- L4055			62.80		99.20		28.20		45.50		96.70		58.80		99.80		13.10		34.10		71.70		63.60	

Figura 30

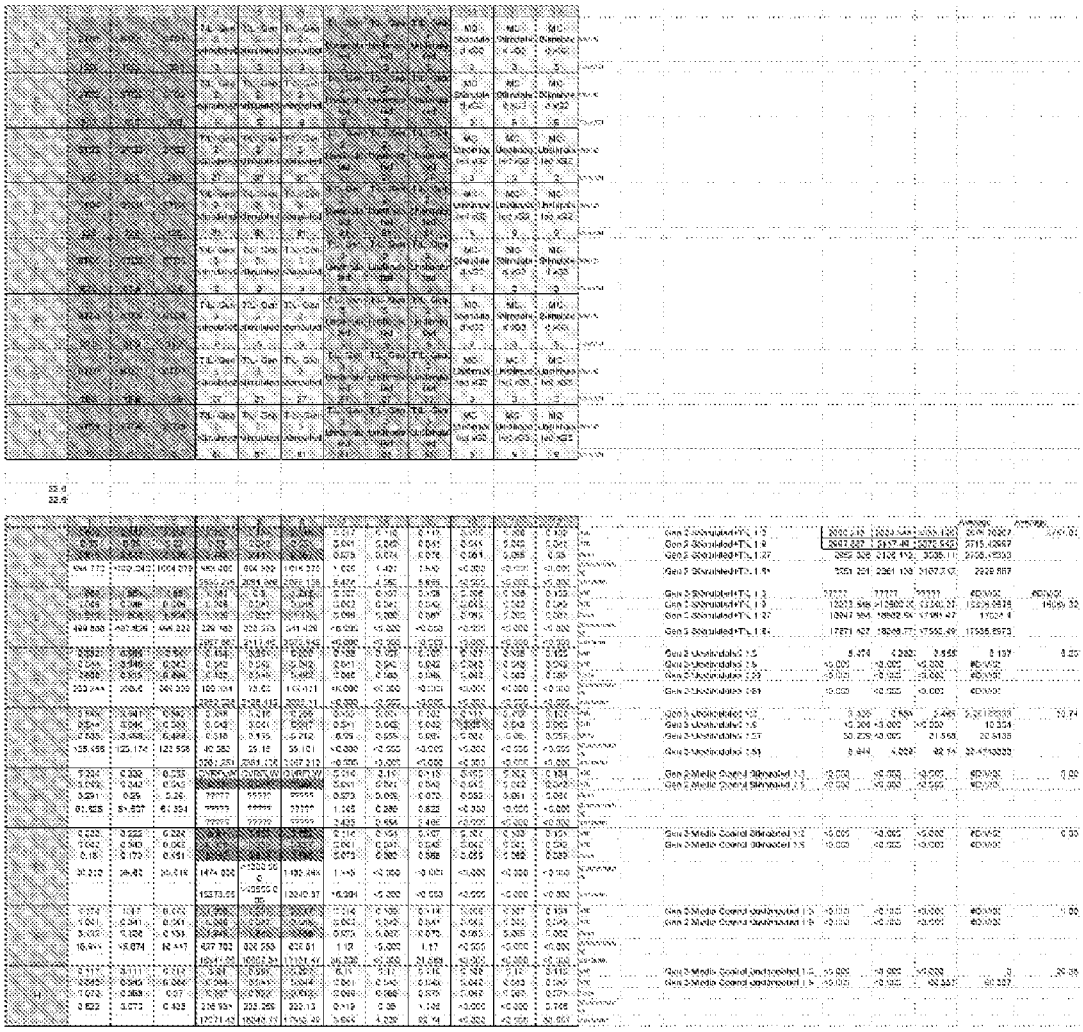


Figura 31

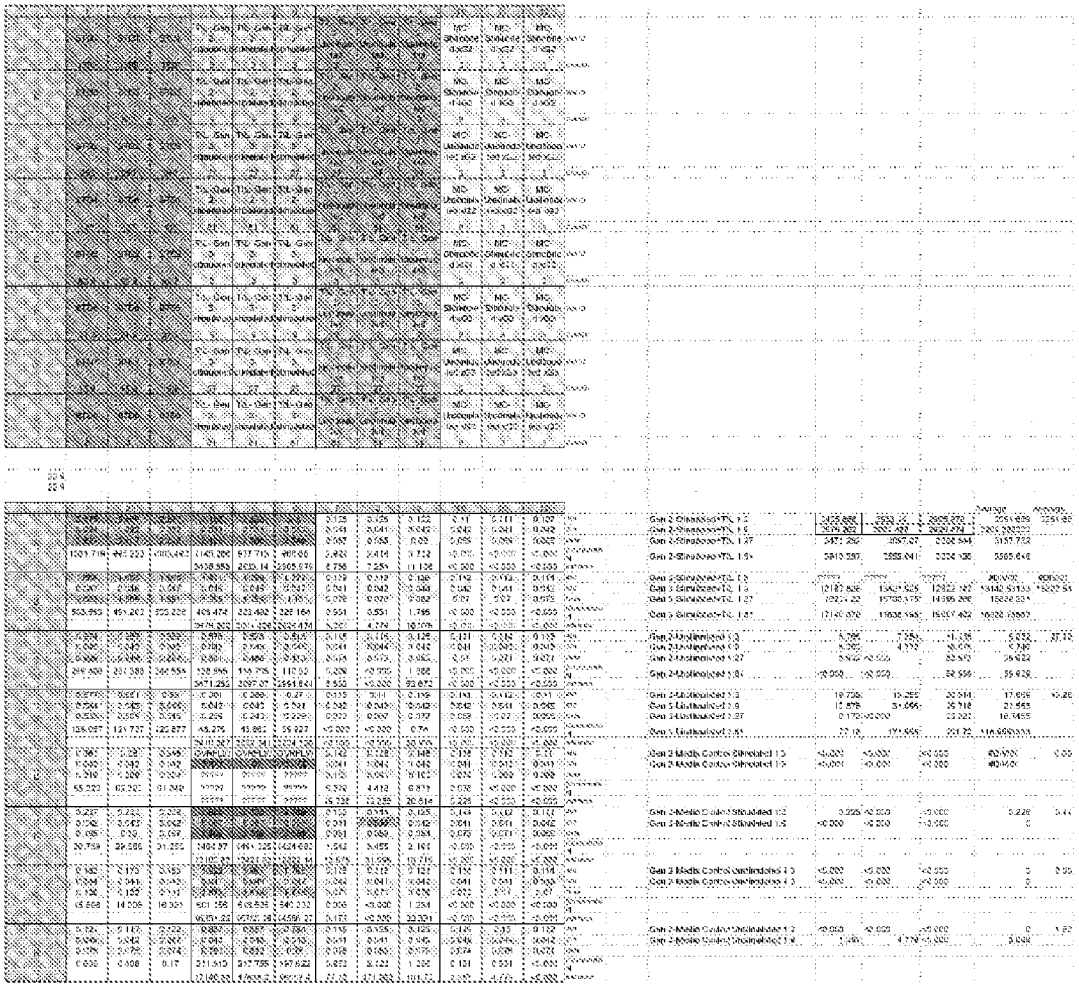


Figura 32

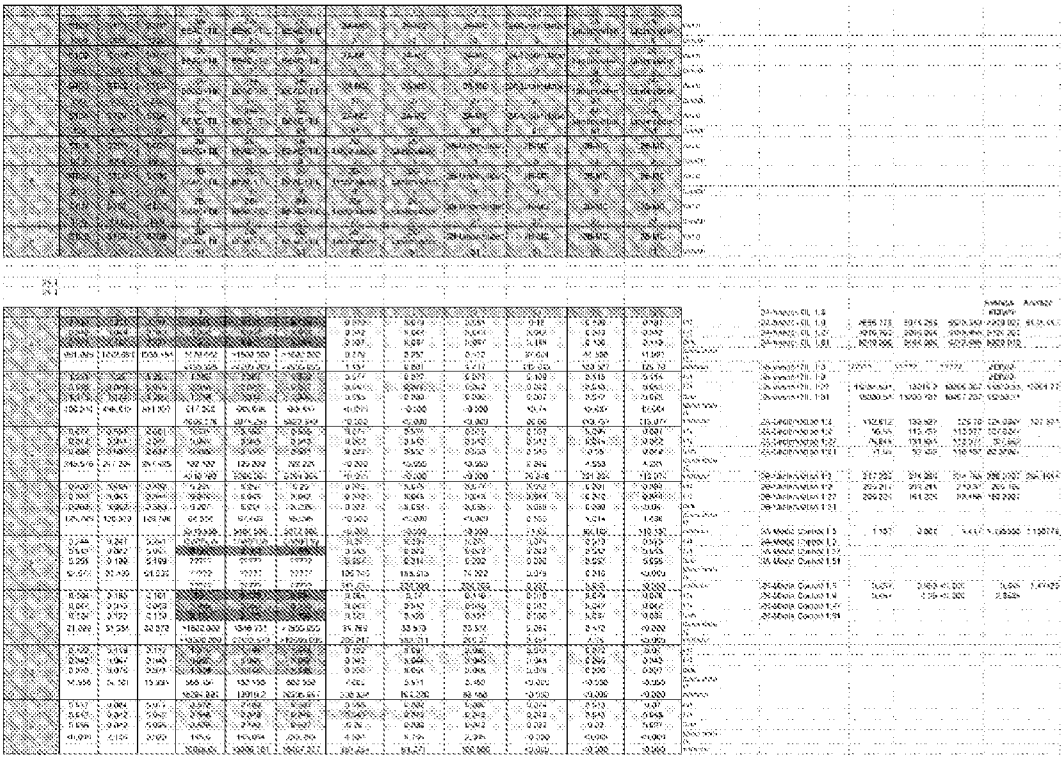


Figura 33

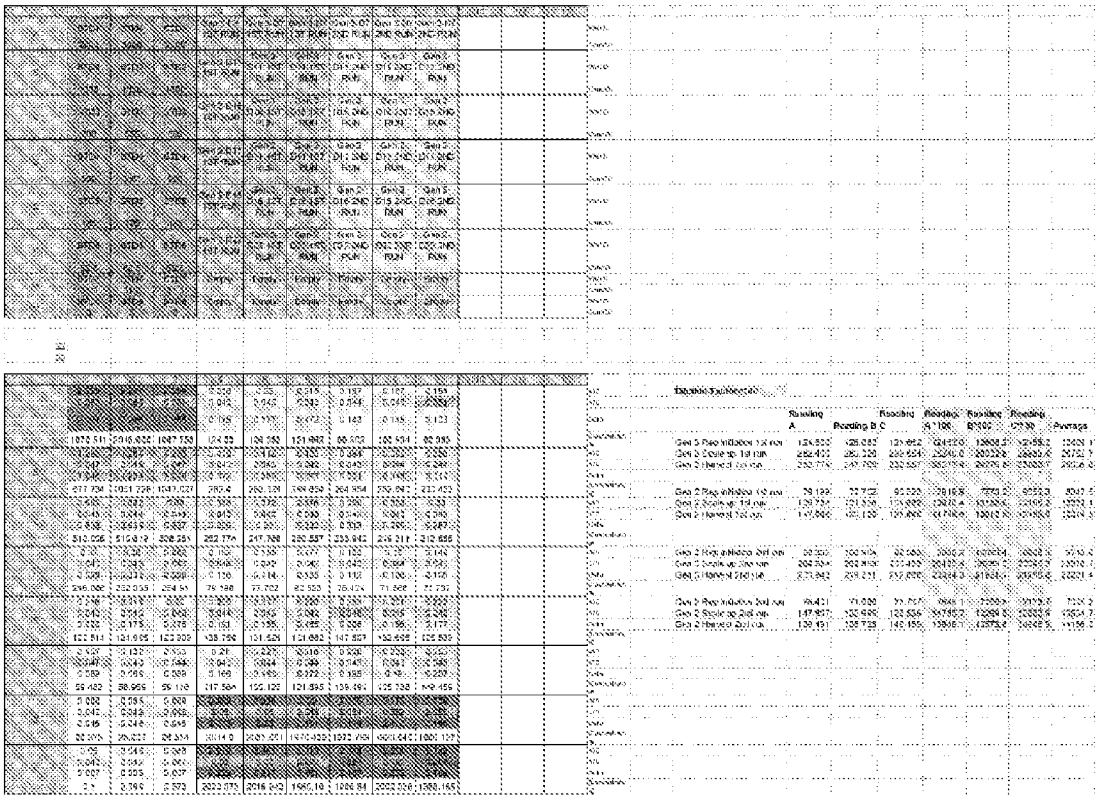


Figura 34

Núm. muestra #	Descripción	Glucosa (g/L)	Lactato (g/L)	Amonio (mmol/L)	Glutaminas (mmol/L)	Glutamax (mmol/L)	Glutamax-Glutaminas (mmol/L)
1	Gen 0 - Inoculación Rep Primera Ronda #140854	1.78	0.54	2.36	1.56	1.73	0.16
2	Gen 0 - Aumento Primera Ronda #140854	1.36	0.89	1.40	1.76	1.90	0.15
3	Gen 0 - Recolección Primera Ronda #140854	0.83	1.68	2.46	1.69	1.85	0.17
4	Gen 0 - Inoculación Rep Primera Ronda #140855	1.68	0.29	1.70	2.11	2.29	0.18
5	Gen 0 - Aumento Primera Ronda #140855	1.28	0.94	1.64	1.70	1.87	0.16
6	Gen 0 - Recolección Primera Ronda #140855	1.07	1.55	2.23	1.39	1.54	0.14
7	Gen 0 - Inoculación Rep Primera Ronda #140856	1.91	0.08	2.29	1.60	1.74	0.14
8	Gen 0 - Aumento Primera Ronda #140856	1.61	0.77	1.40	1.78	1.93	0.15
9	Gen 0 - Recolección Primera Ronda #140856	0.85	1.86	2.46	1.39	1.55	0.16
10	Gen 0 - Inoculación Rep Primera Ronda #140858	1.77	0.18	1.74	2.06	2.23	0.17
11	Gen 0 - Aumento Primera Ronda #140858	1.60	0.72	1.54	1.68	1.84	0.16
12	Gen 0 - Recolección Primera Ronda #140858	1.44	1.32	2.07	1.79	1.95	0.16

Figura 35

	$FIL	S/L/1301 | Geomet	S/L/Pt | Media Geométrica . (FL03-A)
A1 gen2L4054 ne	A1 gen2L4054 neg.fcs	34.5	3.24
A2 gen2L4054 ne	A2 gen2L4054 neg.fcs	34	3.19
A3 gen2L4054 po	A3 gen2L4054 pos.fcs	1834	70.6
A4 gen2L4054 po	A4 gen2L4054 pos.fcs	1872	70.3
A5 gen2L4055 ne	A5 gen2L4055 neg.fcs	31.9	4.23
A6 gen2L4055 ne	A6 gen2L4055 neg.fcs	32.4	4.87
A7 gen2L4055 po	A7 gen2L4055 pos.fcs	1941	88.7
A8 gen2L4055 po	A8 gen2L4055 pos.fcs	1933	91.1
B1 gen3L4054 ne	B1 gen3L4054 neg.fcs	31.2	3.45
B2 gen3L4054 ne	B2 gen3L4054 neg.fcs	31.9	3.39
B3 gen3L4054 po	B3 gen3L4054 pos.fcs	2016	61.3
B4 gen3L4054 po	B4 gen3L4054 pos.fcs	2014	76.2
B5 gen3L4055 ne	B5 gen3L4055 neg.fcs	33.7	6.76
B6 gen3L4055 ne	B6 gen3L4055 neg.fcs	35.4	6.7
B7 gen3L4055 po	B7 gen3L4055 pos.fcs	2158	99.4
B8 gen3L4055 po	B8 gen3L4055 pos.fcs	1938	99.5
Média	-	998	43.3
SD	-	999	41.3

Figura 36

Estudio	Muestra	Id. Muestra	Especie	Cadena	Lecturas	CDR3	CDR3 único	D50
20180511_Study1_FCA	Gen2-L4054	59990	TRB	h	1181732	1181732	8915	0
20180511_Study1_FCA	Gen3-L4054	59991	TRB	h	1145697	1145697	18130	0
20180511_Study1_FCA	Gen2-L4055	59987	TRB	h	1166465	1166465	12996	0.1
20180511_Study1_FCA	Gen3-L4055	59982	TRB	h	1059985	1059985	27246	0.9

Figura 37

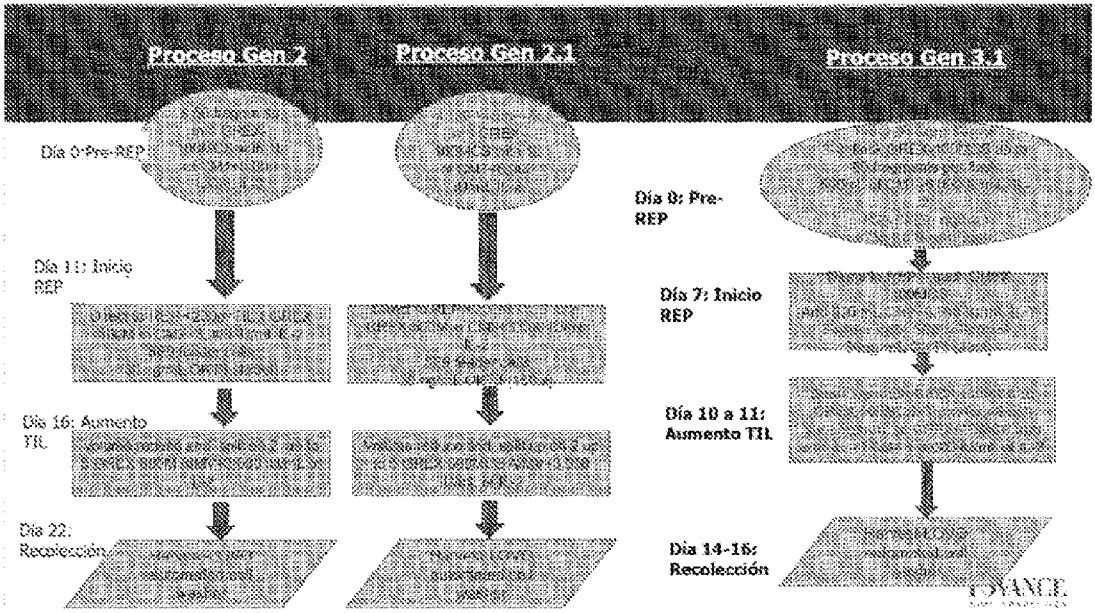

Proceso Gen 2
Proceso Gen 2.1
Proceso Gen 3.1
Día 0:Pre-REP
Día 11: Inicio REP
Día 16: Aumento TIL
Día 22: Recolección
Día 8: Pre-REP
Día 7: Inicio REP
Día 10 a 11: Aumento TIL
Día 14-16: Recolección

Figura 38

ETAPA	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0 Optimizado
Pre-REP Día 0	<50 fragmentos/ 1 G-Rex 100MCS – 11 días	< 180 fragmentos 3 G-Rex Medio calentado CMT preformulado 100MCS-11 days	*Tumor fresco o congelado* (...) 100MCS (hasta 4 G-rex) Medio caliente preformulado - 2 días, Pre-REP, (...) Células ES + OAK-3 (30g/mL)
Inicio REP	Directo a REP- Día 11 <200 EG TIL 1 G-Rex 500MCS	Directo a REP- Día 11 <200 EG TIL Medio calentado CM2 preformulado hecho en uno G-Rex-500MCS	Directo a REP – día 7 – todas células TIL – mismo G-Rex 100MCS (100MCS hasta 4 GREX), medio estándar o medio definido (sin suero). Adición (...) células ES + OAK-3 (30 g/mL)
Propagación TIP o aumento	1 a 5 G-Rex 100MCS División día 16	2 a 5 G-Rex 500MCS Medio calentado CM2 preformulado División día 16	(...) Aumento día 10 o 11
Recolección	Recolección día 22 LOVO: lavadora de células automatizada	Recolección día 22 LOVO: lavadora de células automatizada (5 ciclos de lavado)	Recolección día 14 o 16 LOVO: lavadora de células automatizada (5 ciclos de lavado)
Formulación final	Producto criopreservado 300 UI/mL IL-2 CS10 en N2 en múltiples alícuotas	Producto criopreservado 300 UI/mL IL-2 CS10 en N2 en múltiples alícuotas	Producto criopreservado 300 UI/mL IL-2 CS10 en N2 en múltiples alícuotas
Tiempo de proceso	**22 días**	**22 días**	**16 días**

Figura 39

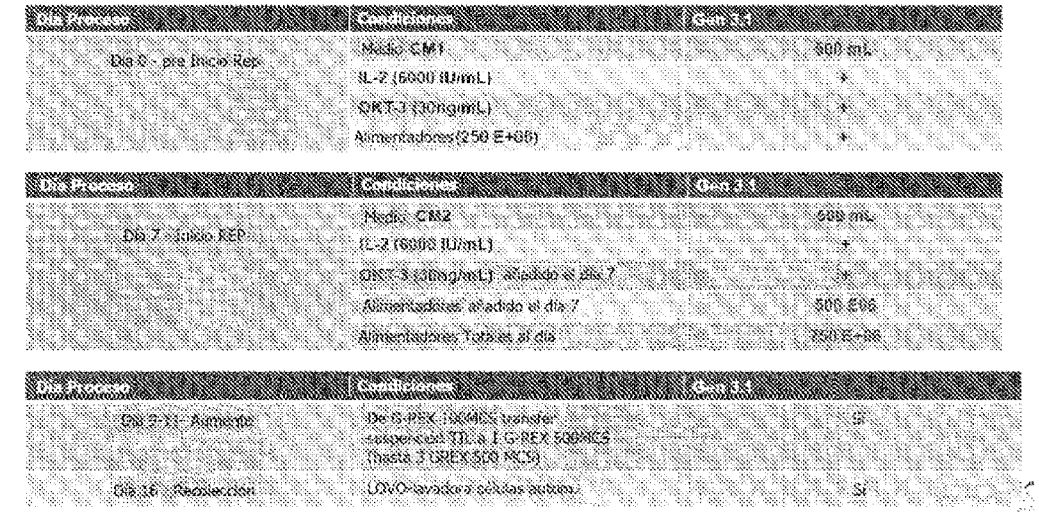

Día Proceso
Condiciones
Cant.(L)
Día 0 - pre Inicio Rep
Medio CM1
500 mL
IL-2 (6000 IU/mL)
+
OKT-3 (30ng/mL)
+
Alimentadores(250 E+06)
+
Día Proceso
Condiciones
Cant.(L)
Día 7 - Inicio REP
Medio CM2
500 mL
IL-2 (6000 IU/mL)
+
OKT-3 (30ng/mL) añadido el día 7
+
Alimentadores añadido el día 7
500 E06
Alimentadores Totales al día
750 E+06
Día Proceso
Condiciones
Cant.(L)
Día 7-11 - Aumento
De G-REX 100MCS transfer
«supernatant TIL» a 1 G-REX 500MCS
Hasta 3 GREX 500 MCS)
SI
Día 16 - Recolección
LOVO-lavados celulas activas
SI

Figura 40

Comparación de procesos	Cambios clave en el proceso	Beneficio
Gen 2: Gen 2.1	Iniciar el proceso con dos frascos en lugar de uno Dividir la capa de alimentación de inicio REP entre 2 frascos G-Rex500MCS Medios preformulados y calentados antes de su uso.	Posible duplicación del recuento celular final (dosis) con un mayor repertorio de TIL. Redundancia del proceso a lo largo del proceso
Gen 2.1: Gen 3.1	Tumor fresco o congelado. Proceso de 14-16 días (a partir de 22 días). Reducción de la capa de alimentación total en el proceso. Capa de alimentación y OKT3 presentes en el día 0. Inicio REP con fragmentos. 100MCS se escala a 500MCS. Escalado a múltiples frascos previos a la REP. Medios estándar y medios definidos (sin suero).	Mayor potencia Fenotipo mejorado Menor tiempo de proceso. Reducción de las pruebas de reactivos Menor variabilidad del proceso Reactivos definidos Mayor repertorio Reducción de impurezas (alimentador) Dosis comparable o superior.

Figura 41

Comparación de procesos	Cambios clave en el proceso	Mejora deseada	Criterios de éxito	Mejora deseada
Gen 2: Gen 3.0	14-16 días Iniciar REP con fragmentos de hasta 4 matraz. Escalas de 100 MCS a 500 MCS	Aumento de la Potencia Fenotipo mejorado Disminución del tiempo de proceso	Aumento de la potencia medido por INF-g✓ Fenotipo comparable✓ Dosis comparable✓ Pureza comparable (célula alimentadora) Mantener la diversidad clonal✓	Aumento de la potencia sobre Gen2 Mejora de la expresión de CD28 en células CD8 Capacidad máxima de matraz alcanzada el día 16 en Gen 3.1 Reducción del uso de células alimentadoras Aumento de la diversidad

Figura 42

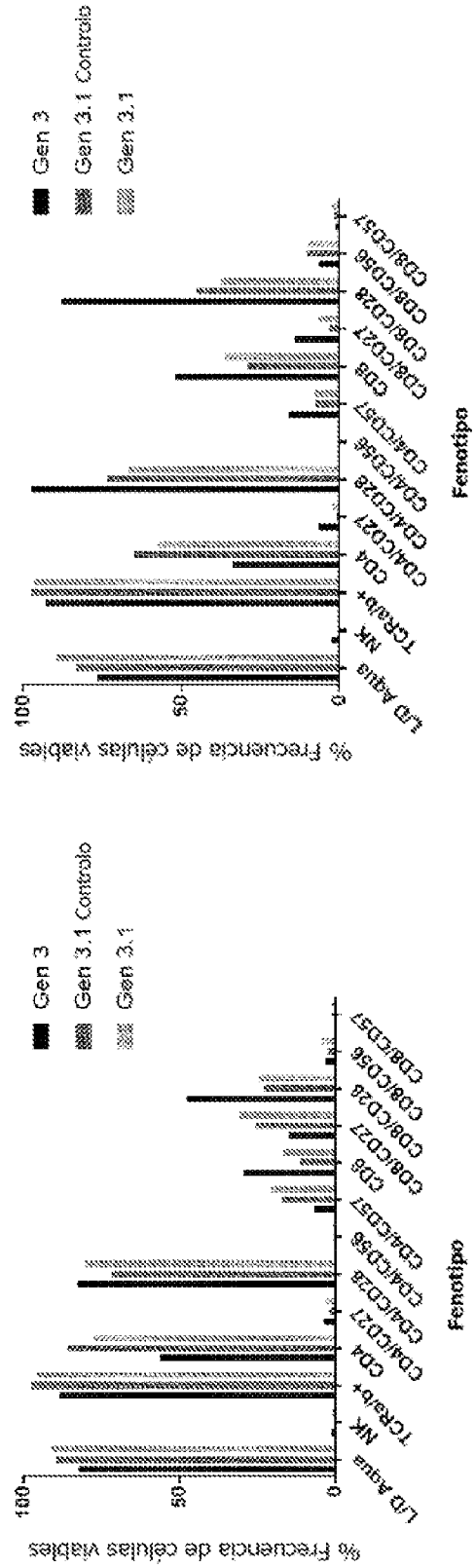
Proceso	Gen 2	Gen 3
L4054	Medios Estándar	Medios Estándar
L4055	Medios Estándar	Medios Estándar
M1085T	Medios Estándar	Medios Estándar

Proceso	Gen 3	Gen 3.1 control	Gen 3.1
L4083	Medios Estándar	Medios Estándar	Medios Estándar
L4084	Medios definidos	Medios definidos	Medios definidos

Medios estándar:
Pre REP: CM1
Inicio REP: CM2
Dividir o ampliar: CM4

Medios definidos:
Optimizador CTS (medios sin suero) en cada día del proceso

Figura 43



Tumor ID	L4063 Media estándar			L4064 Medio definido		
Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1
# Fragmentos	53	53	53	21	21	21

Figura 44

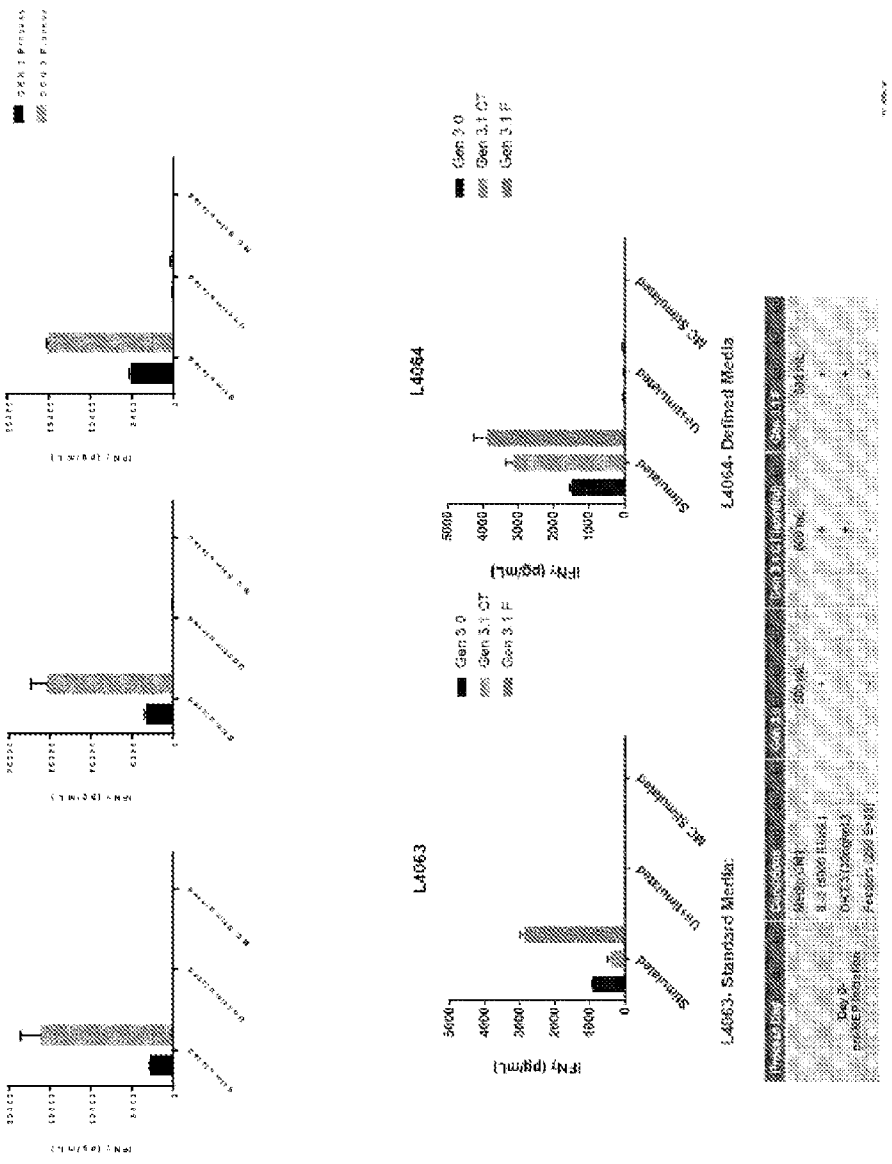

L4064
L4063
L4064. Defined Media
L4063. Standard Media:
Gen 3.0
Gen 3.1 CT
Gen 3.1 P
Stimulated
Unstimulated
IFNγ (pg/mL)

Figura 45

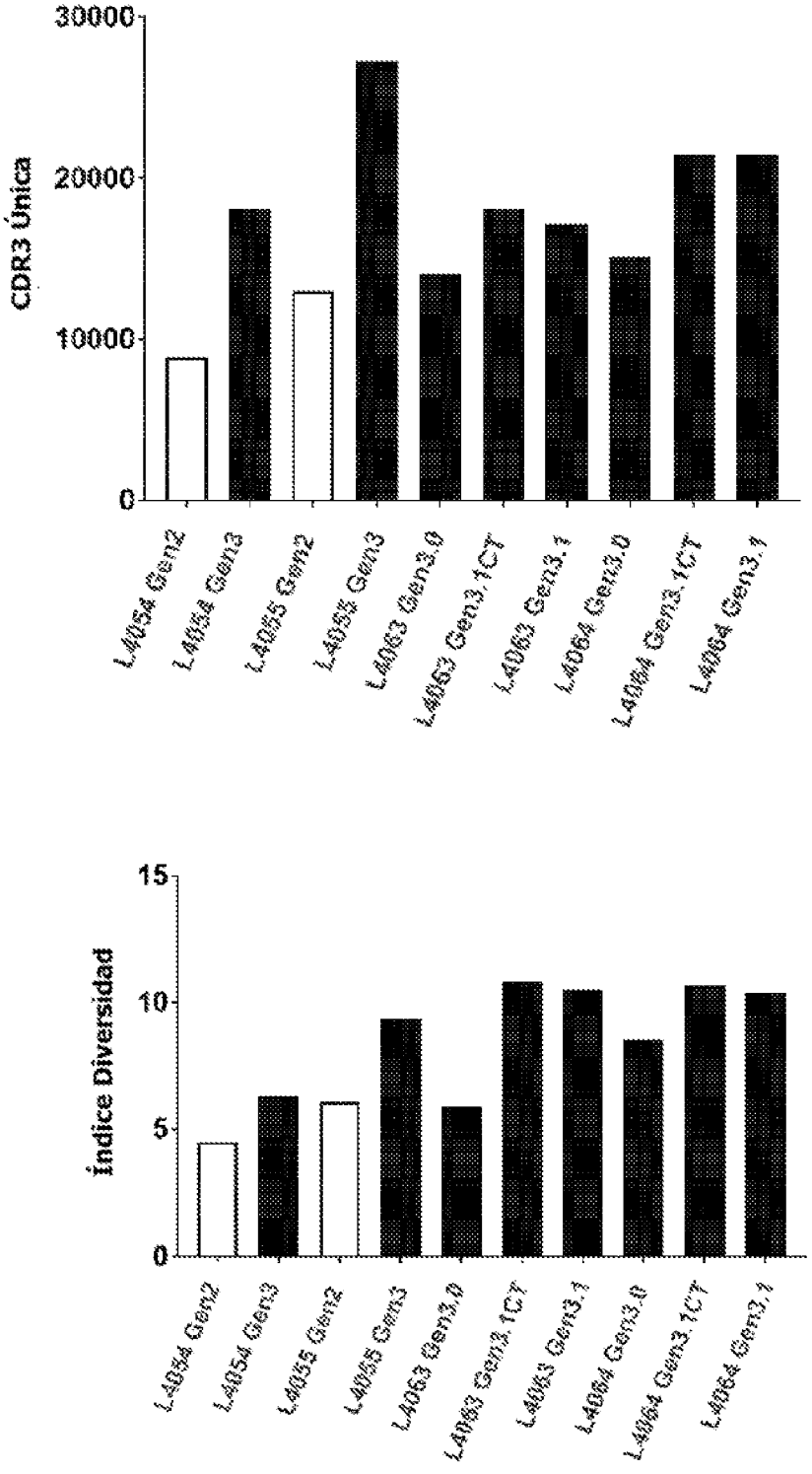

CDR3 Única
30000
20000
10000
0
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1
Índice Diversidad
15
10
5
0
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1

Figura 46

Condiciones + Día 0	Gen 3.0	Gen 3.1 (control)	Gen 3.1
Media	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
Alimentadores (250 E+06)	-	-	+

Número de uCDR3 (% solapamento)	Todas uCDR3			Top 80% uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1	Gen 3.1	Gen 3.1 control	Gen 3.1
Gen 3.0	14005	3240 (23)	2959 (21)	1105	1000 (90)	975 (88)
Gen 3.1 controlo	-	18149	-	-	2438	-
Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2332

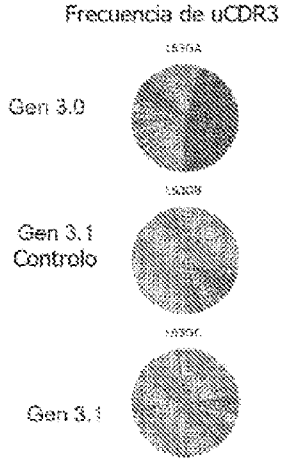


Figura 47

Condiciones al Día 0	Gen 3.0	Gen 3.1 (control)	Gen 3.1
Media	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/mL)	+	+	+
Alimentadores (250 E+06)	+	+	+

	Todas uCDR3			Top 80% uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1
Gen 3.0	15107	5486 (36)	5541 (37)	2479	2186 (88)	2163 (87)
Gen 3.1 controlo	-	21460	-	-	3247	-
Gen 3.1	-	-	21503	-	-	4264

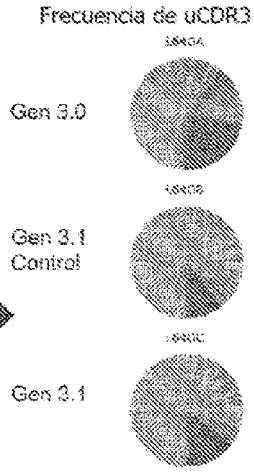


Figura 48

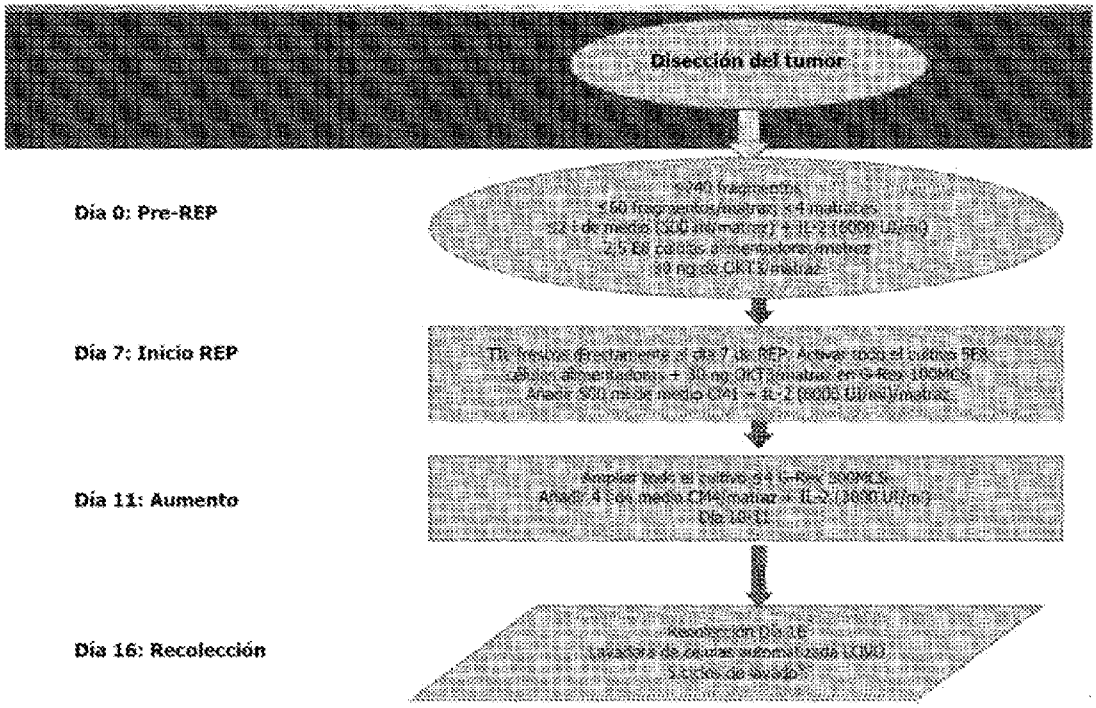

Disección del tumor
Día 0: Pre-REP
Día 7: Inicio REP
Día 11: Aumento
Día 16: Recolección

Figura 49

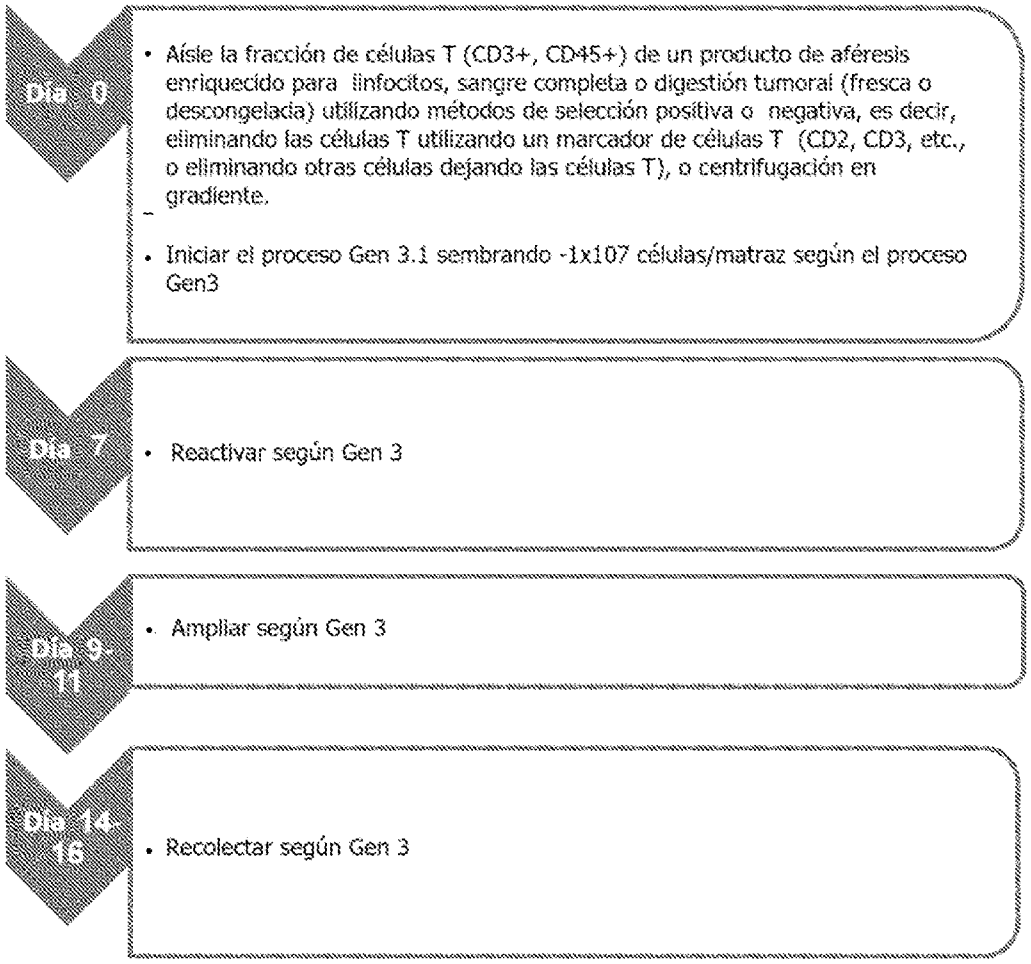
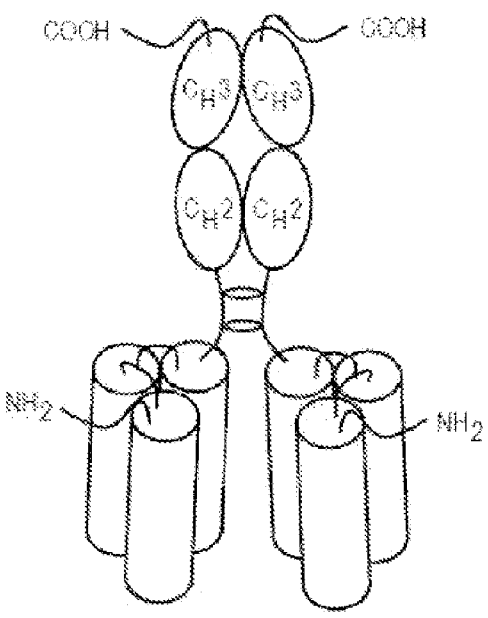
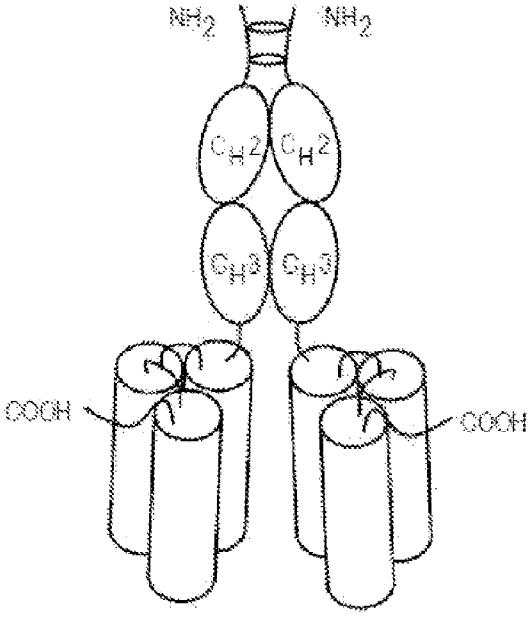

Día 0
• Aísle la fracción de células T (CD3+, CD45+) de un producto de aféresis enriquecido para linfocitos, sangre completa o digestión tumoral (fresca o descongelada) utilizando métodos de selección positiva o negativa, es decir, eliminando las células T utilizando un marcador de células T (CD2, CD3, etc., o eliminando otras células dejando las células T), o centrifugación en gradiente.
• Iniciar el proceso Gen 3.1 sembrando ~1x107 células/matraz según el proceso Gen3
Día 7
• Reactivar según Gen 3
Día 9-11
• Ampliar según Gen 3
Día 14-16
• Recolectar según Gen 3

Figura 50



Estructura I-A



Estructura I-B

Figura 51

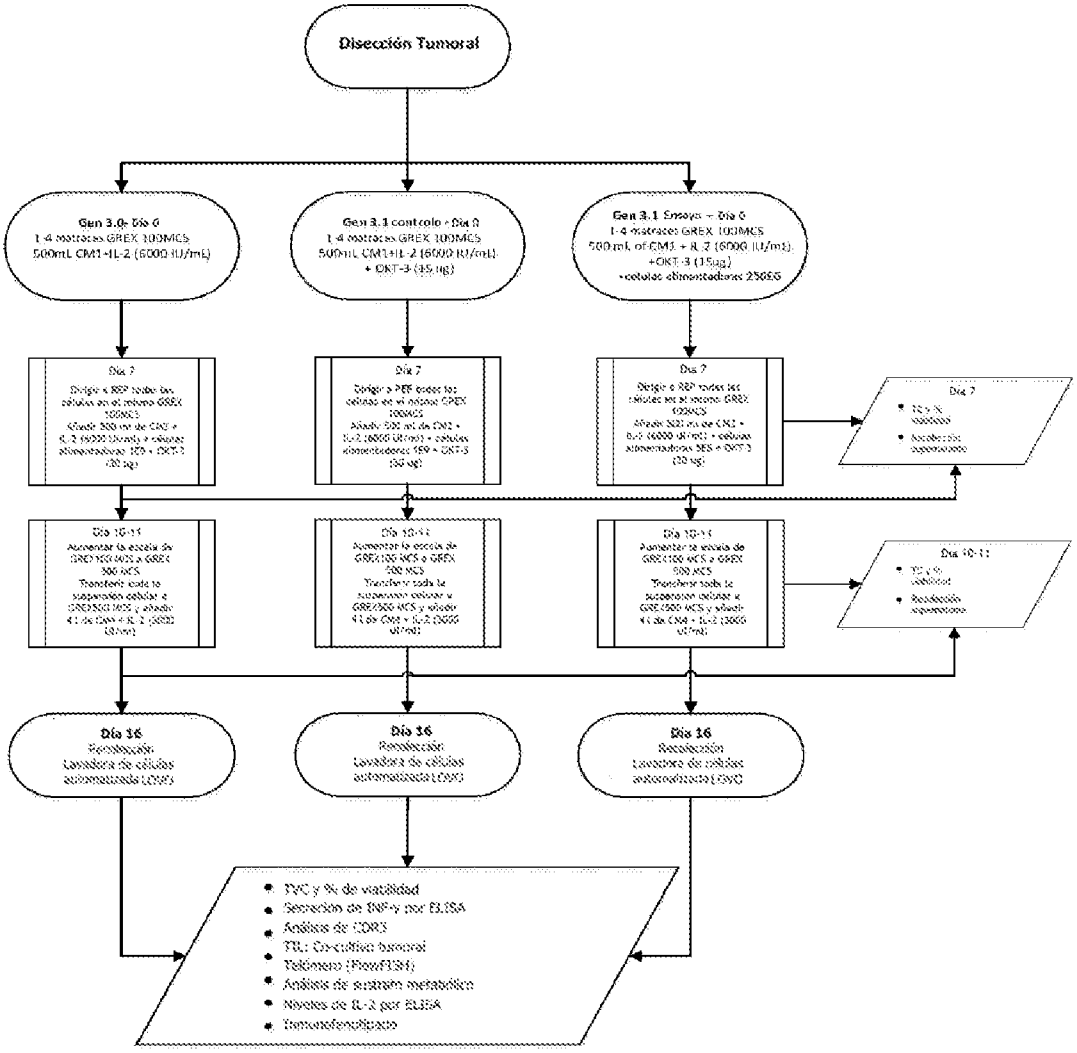

Disección Tumoral
Gen 3.0- Día 0
1-4 matraces GREX 100MCS
500mL CM1+IL-2 (6000 IU/mL)
Gen 3.1 control - Día 0
1-4 matraces GREX 100MCS
500mL CM1+IL-2 (6000 IU/mL)
+ OKT-3 (35 ng)
Gen 3.1 Ensayo - Día 0
1-4 matraces GREX 100MCS
500mL of CM3 + IL-2 (6000 IU/mL)
+OKT-3 (15µg)
+células alimentadoras 2505G
Día 7
Día 7
Día 7
Día 10-11
Día 10-11
Día 10-11
Día 16
Recolección:
Día 16
Recolección:
Día 16
Recolección
Leucoféresis (CSV)
Leucoféresis (CSV)
Leucoféresis (CSV)
TVC y % de viabilidad
Secreción de INF-γ por ELISA
Análisis de CDR3
TRL: Co-cultivo tumoral
Telómero (Flow/FISH)
Análisis de sustrato metabólico
Niveles de IL-2 por ELISA
Inmunofenotipado

Figura 52

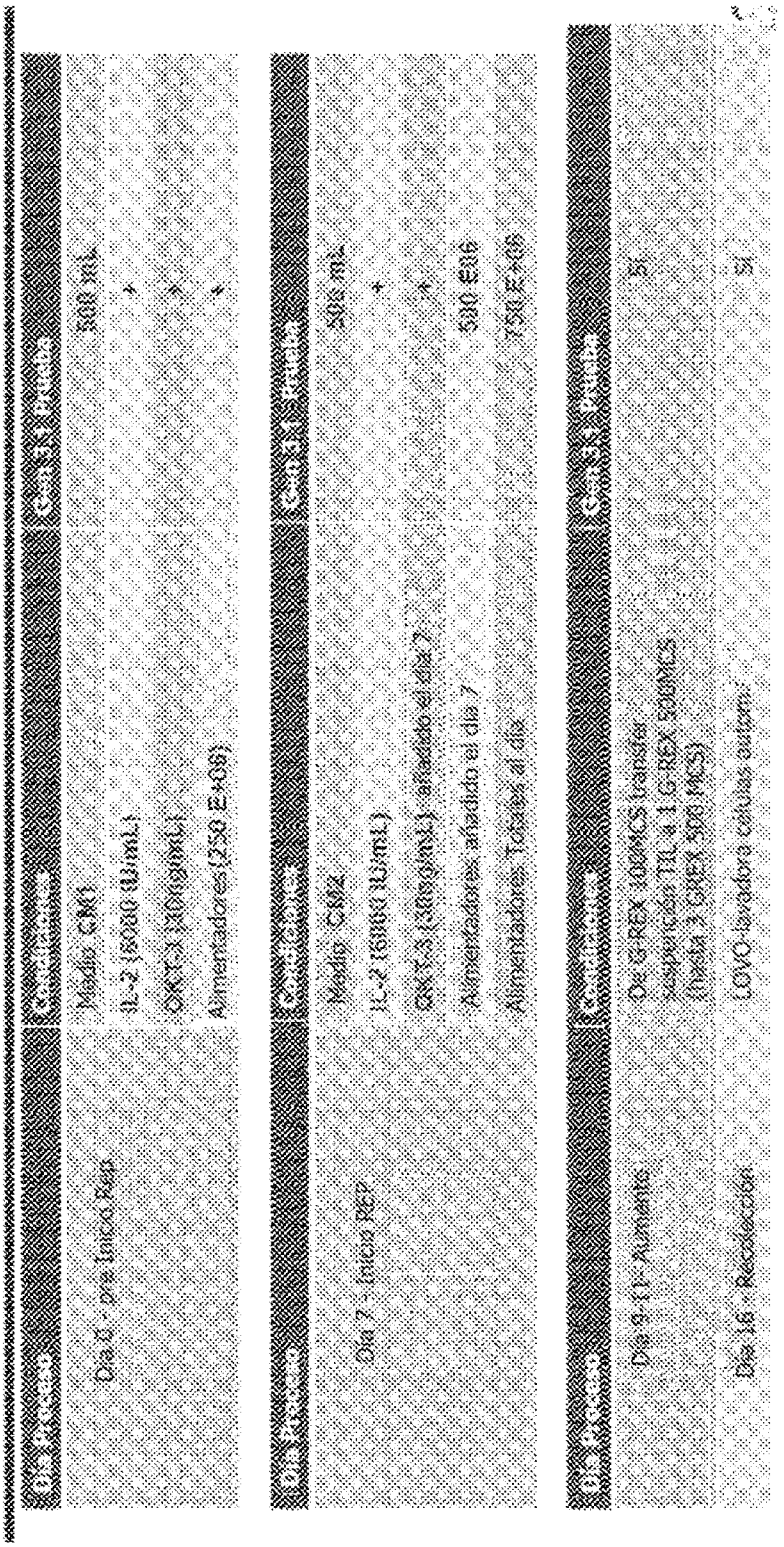
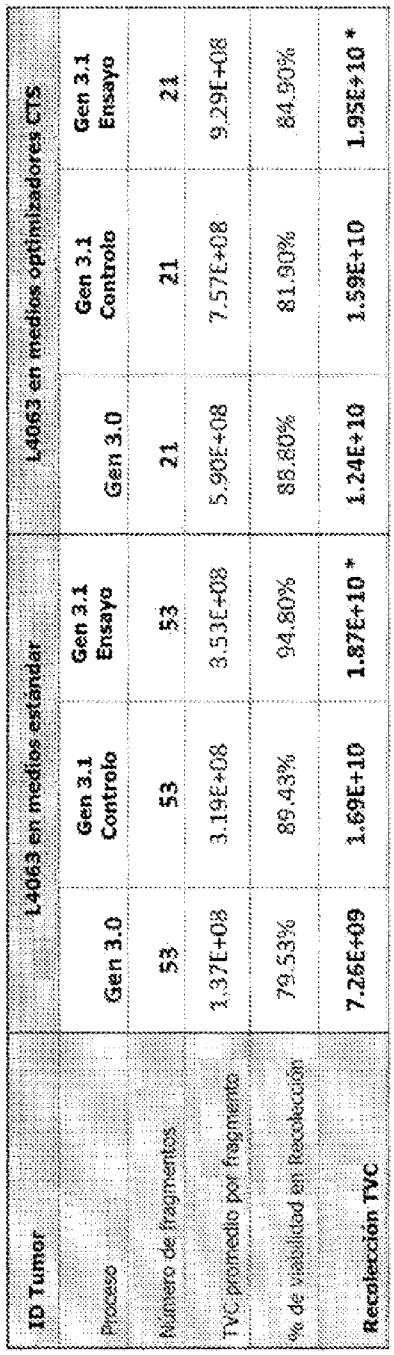

Día 0 (inicio)
Condiciones
IC-cels 3 (1 Frasco)
Día 0 - pre Inicio Rep
Medio CM1
500 mL
IL-2 (6000 IU/mL)
+
OKT-3 (30ng/mL)
+
Alimentadores (250 E+09)
+
Día 7 (inicio)
Condiciones
IC-cels 3 (1 Frasco)
Día 7 - Inicio REP
Medio CM2
500 mL
IL-2 (6000 IU/mL)
+
OKT-3 (30ng/mL) añadido el día 7
+
Alimentadores añadido el día 7
500 E06
Alimentadores Tobas el día
750 E+09
Día 11 (Cosecha)
Condiciones
IC-cels 3 (1 Frasco)
Día 9-11- Aumento
Si
Día 16 - Recolección
Si

Figura 53



ID Tumor	L4063 en medios estándar			L4063 en medios optimizadores CTS		
Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Controlo	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Controlo	Gen 3.1 Ensayo
Número de fragmentos	53	53	53	21	21	21
TVC promedio por fragmento	1.37E+08	3.19E+08	3.53E+08	5.90E+08	7.57E+08	9.29E+08
% de viabilidad en Recolección	79.53%	89.43%	94.80%	88.80%	81.90%	84.90%
Recolección TVC	**7.26E+09**	**1.69E+10**	**1.87E+10 ***	**1.24E+10**	**1.59E+10**	**1.95E+10 ***

Figura 54

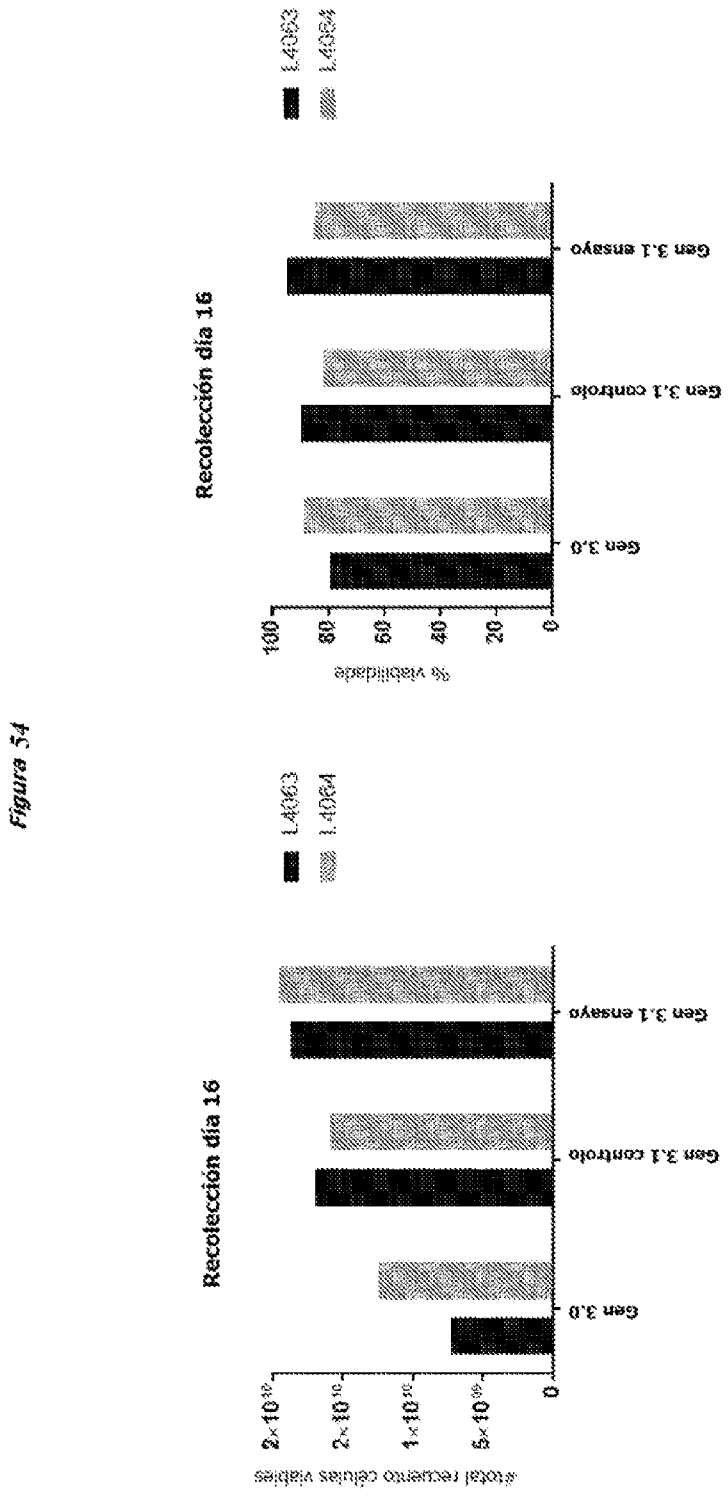
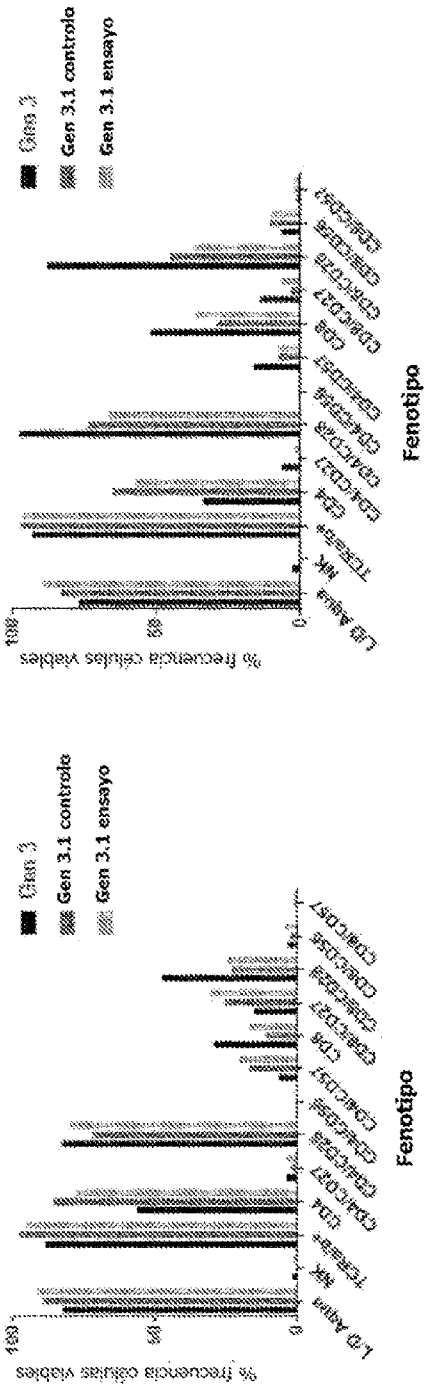

L4063
L4064
Recolección día 16
% viabilidad
100
80
60
40
20
0
Gen 3.0
Gen 3.1 control
Gen 3.1 ensayo
L4063
L4064
Recolección día 16
total recuento células viables
2×10^10
2×10^10
1×10^10
5×10^9
0
Gen 3.0
Gen 3.1 control
Gen 3.1 ensayo

Figura 55



ID Tumor	L4063 Medios estándar			L4063 medios definidos		
Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
#Fragmentos	52	53	53	21	21	21

Figura 56

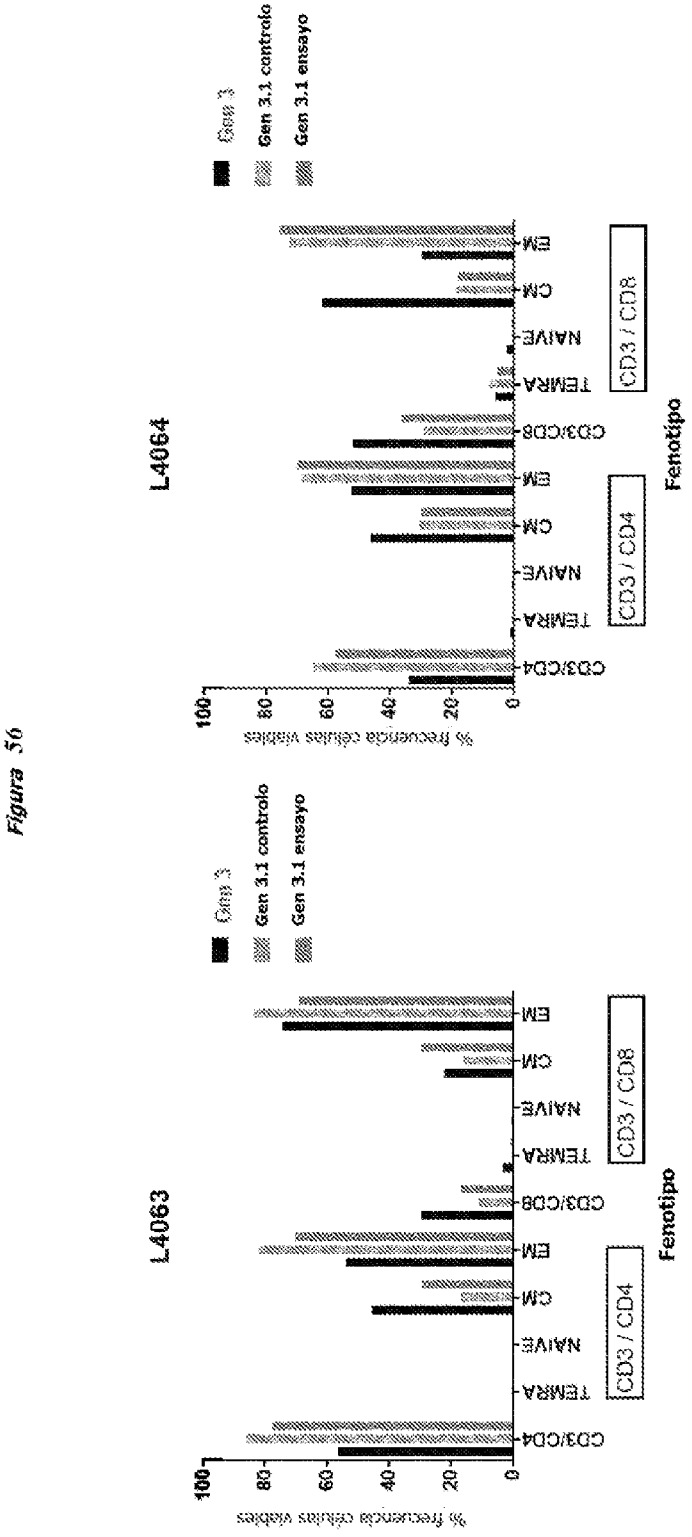

L4063
L4064
Gen 3
Gen 3.1 control
Gen 3.1 ensayo
% frecuencia células viables
100
80
60
40
20
0
CD3/CD4
TEMRA
NAIVE
CM
EM
CD3/CD8
CD3 / CD4
CD3 / CD8
Fenotipo

Figura 57

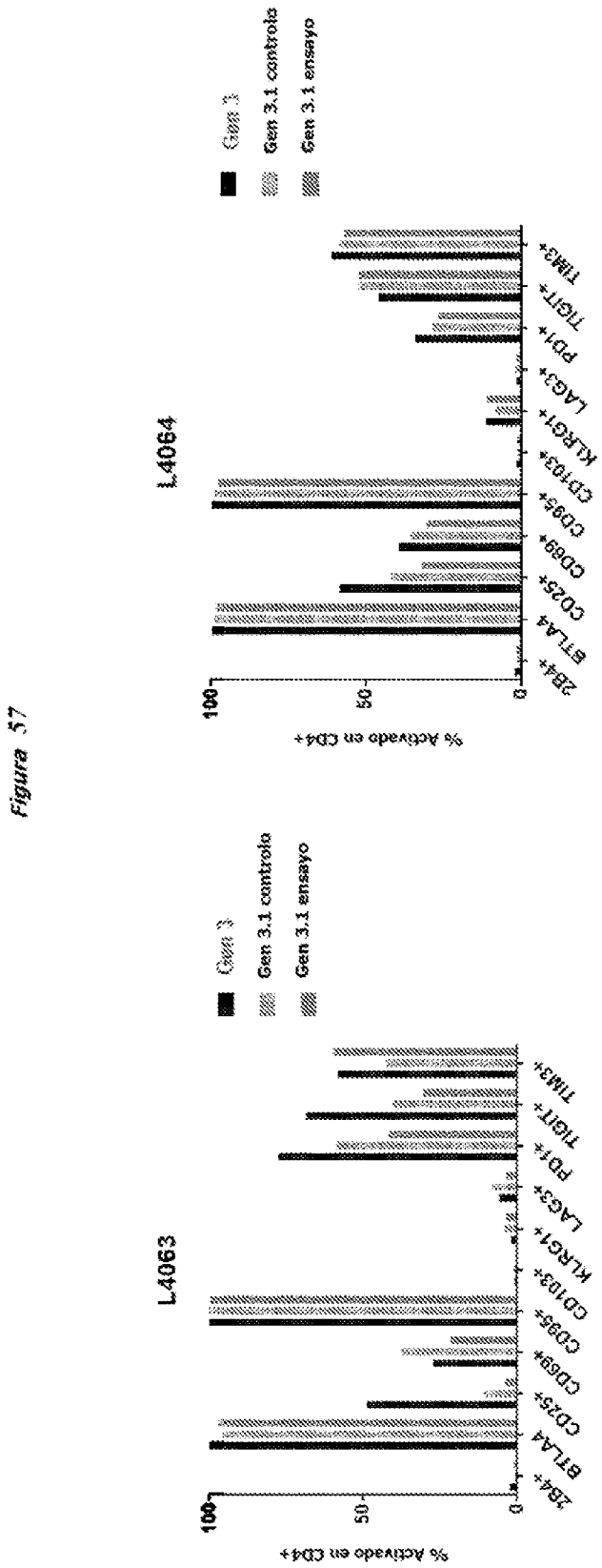

L4063
L4064
Gen 3
Gen 3.1 control
Gen 3.1 ensayo
% Activado en CD4+
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+

Figura 58

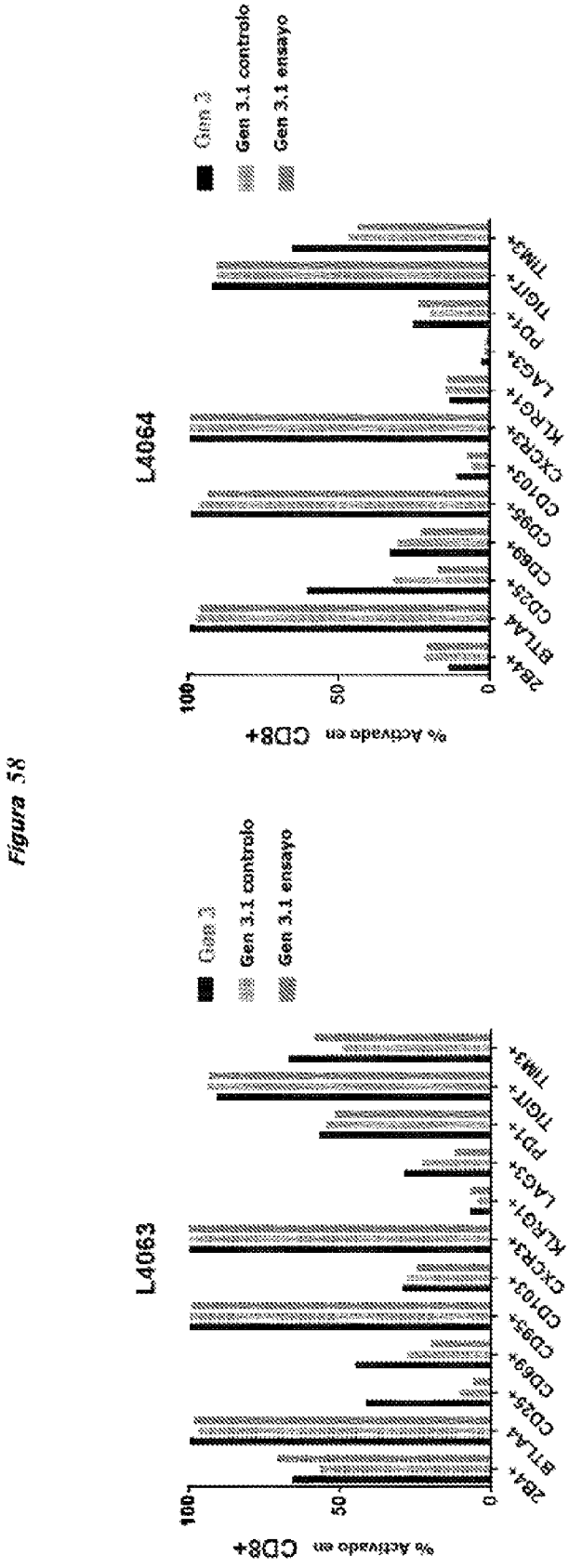
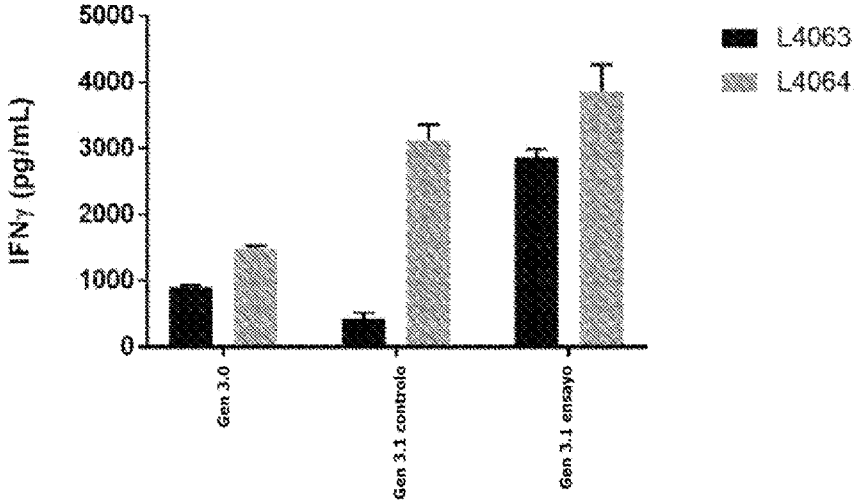

L4063
L4064
Gen 3
Gen 3.1 control
Gen 3.1 ensayo
% Activado en CD8+
100
50
0
2BA+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+

Figura 59



Día Proceso	Condiciones	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
	Medio CM1	500 mL	500 mL	500 mL
Día 0	IL-2 (6000 IU/mL)	+	+	+
Pre inicio REP	OKT-3 (30ng/mL)	+	+	+
	Alimentadoras (250 E+06)	+	+	+

Figura 60

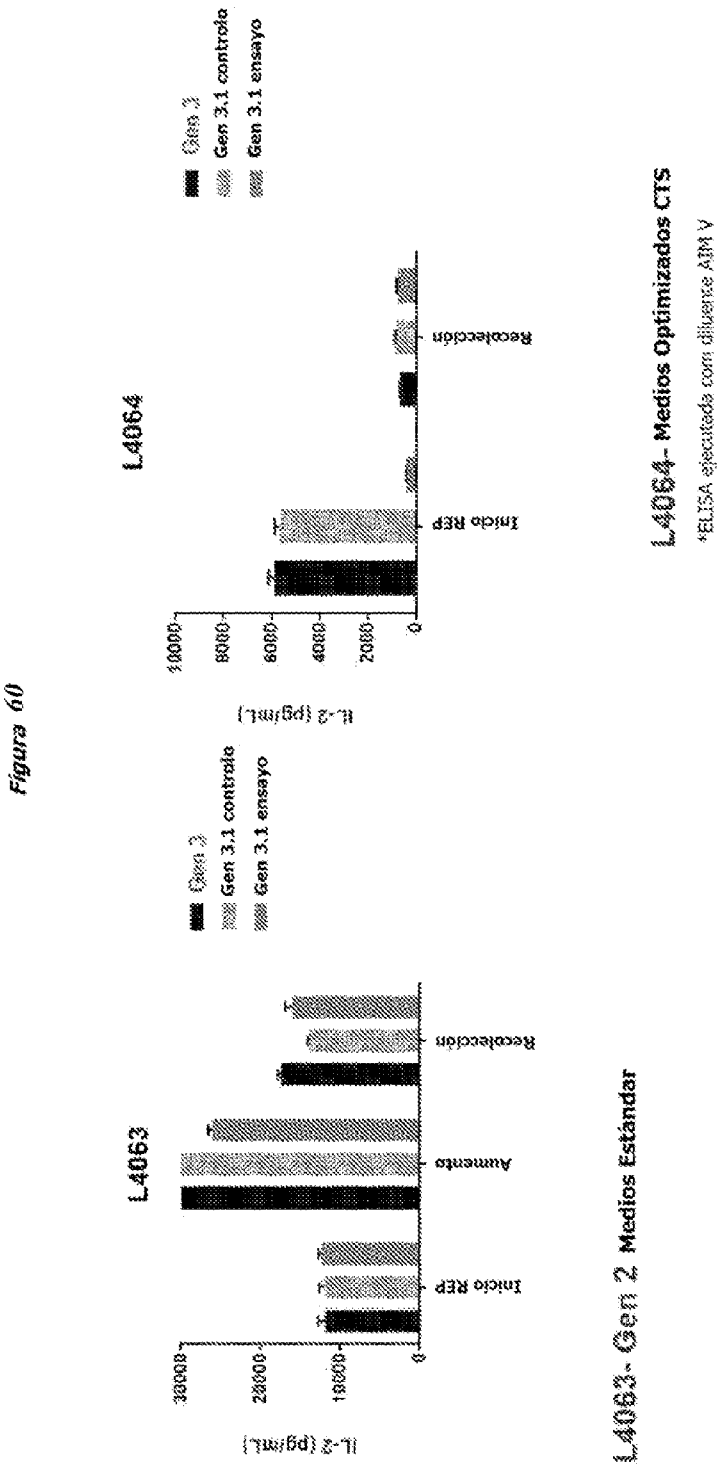

L4063
Gen 3
Gen 3.1 control
Gen 3.1 ensayo
IL-2 (pg/mL)
30000
20000
10000
0
Inicio REP
Aumento
Recolección
L4063- Gen 2 Medios Estándar
L4064
Gen 3
Gen 3.1 control
Gen 3.1 ensayo
IL-2 (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
Inicio REP
Recolección
L4064- Medios Optimizados CTS
*ELISA ejecutada con diluyente AIM V

Figura 61

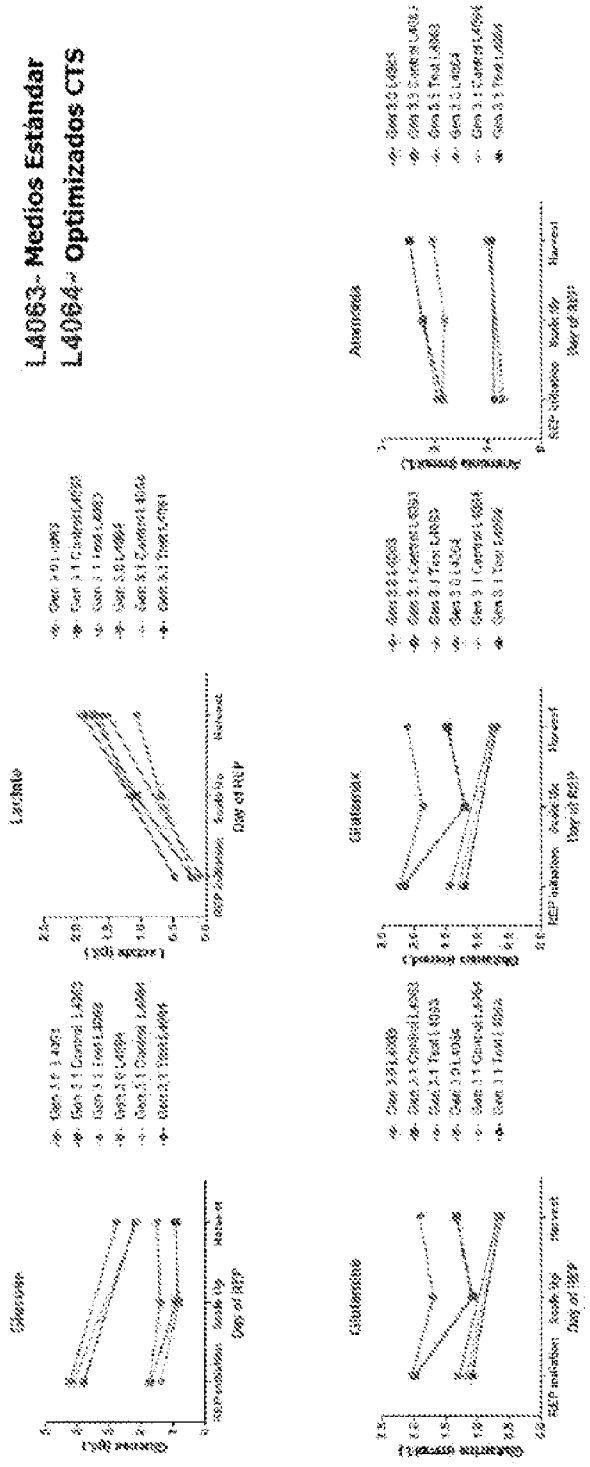

L4063- Medios Estándar
L4064- Optimizados CTS
Glucose
Lactate
Ammonia
Glutamine
Glutamate
Day of REP

Figura 62

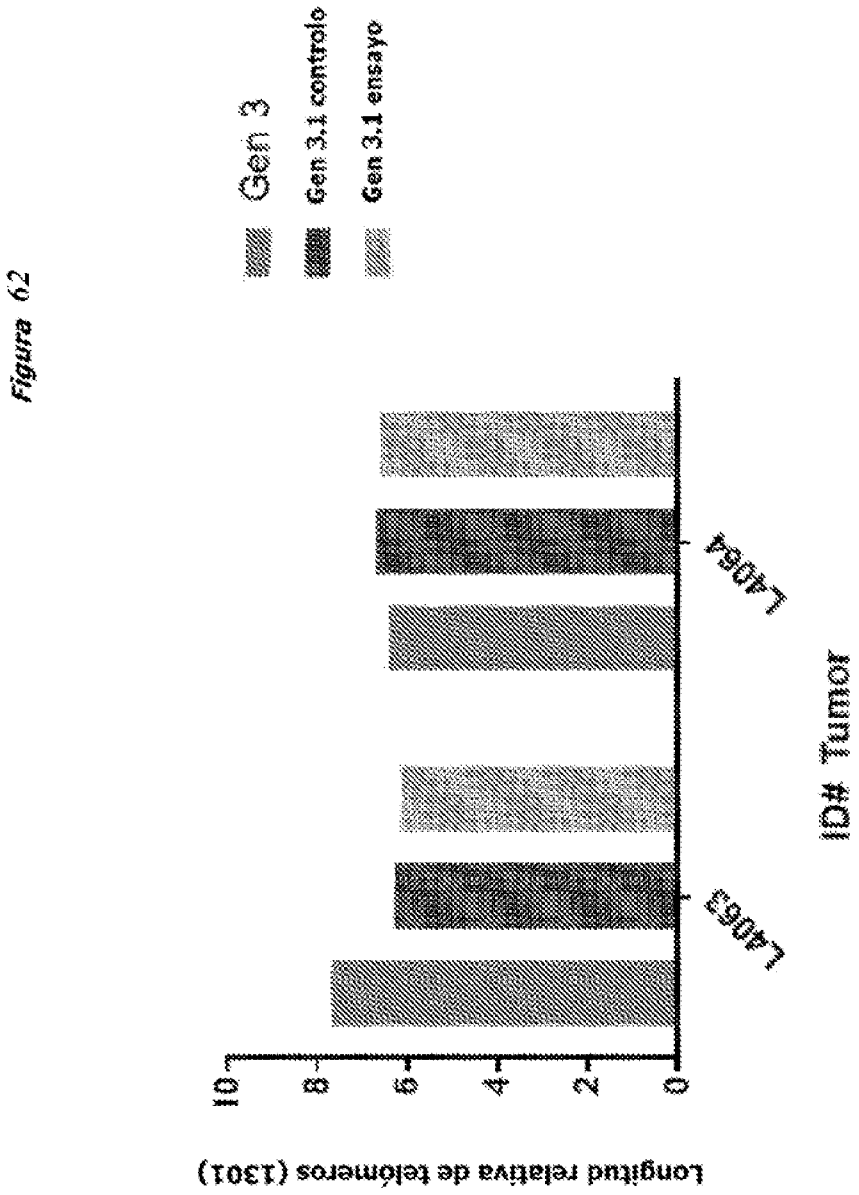

Gen 3
Gen 3.1 control
Gen 3.1 ensayo
Longitud relativa de telómeros (1301)
10
8
6
4
2
0
L406
L406
ID# Tumor

Figura 63

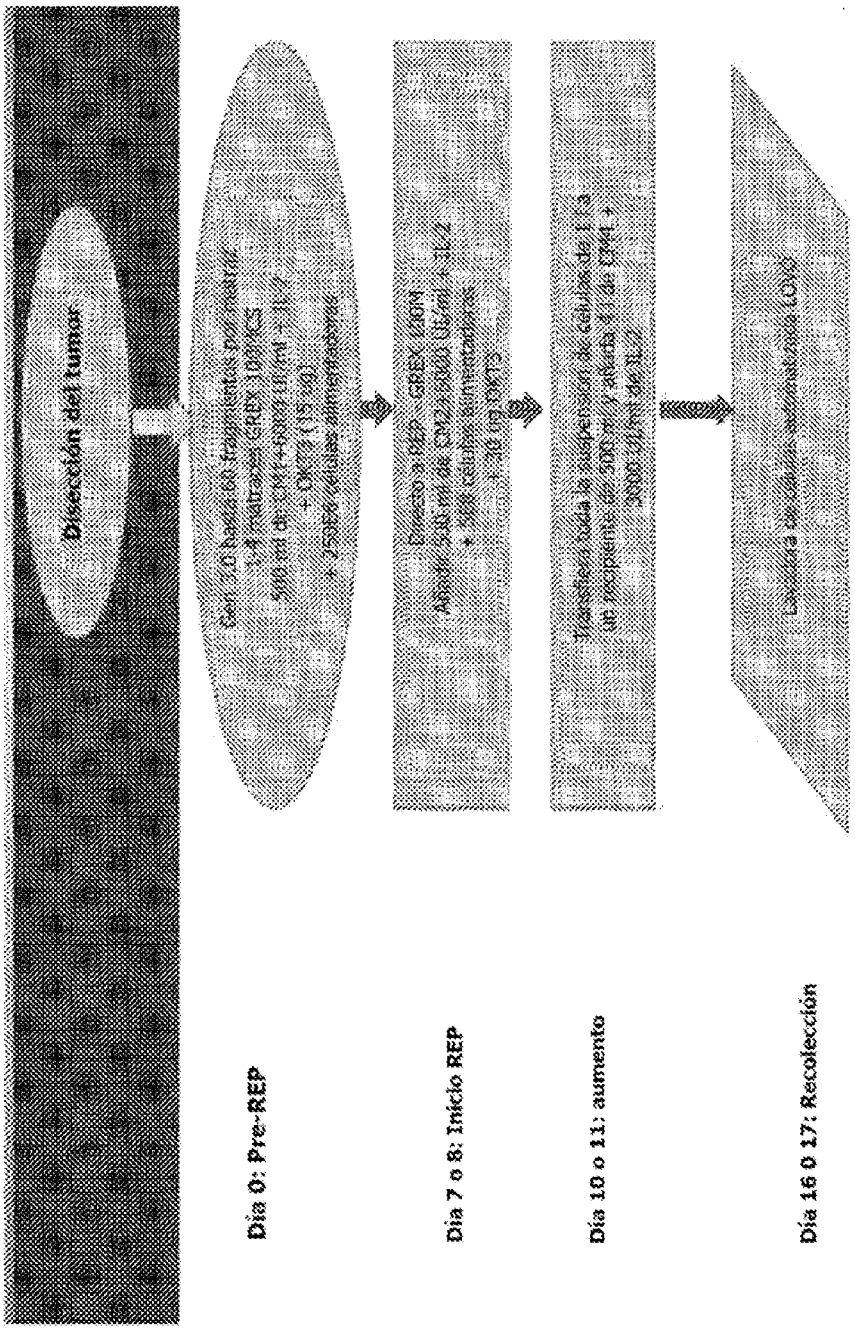

Día 0: Pre-REP
Día 7 o 8: Inicio REP
Día 10 o 11: aumento
Día 16 o 17: Recolección

Figura 64

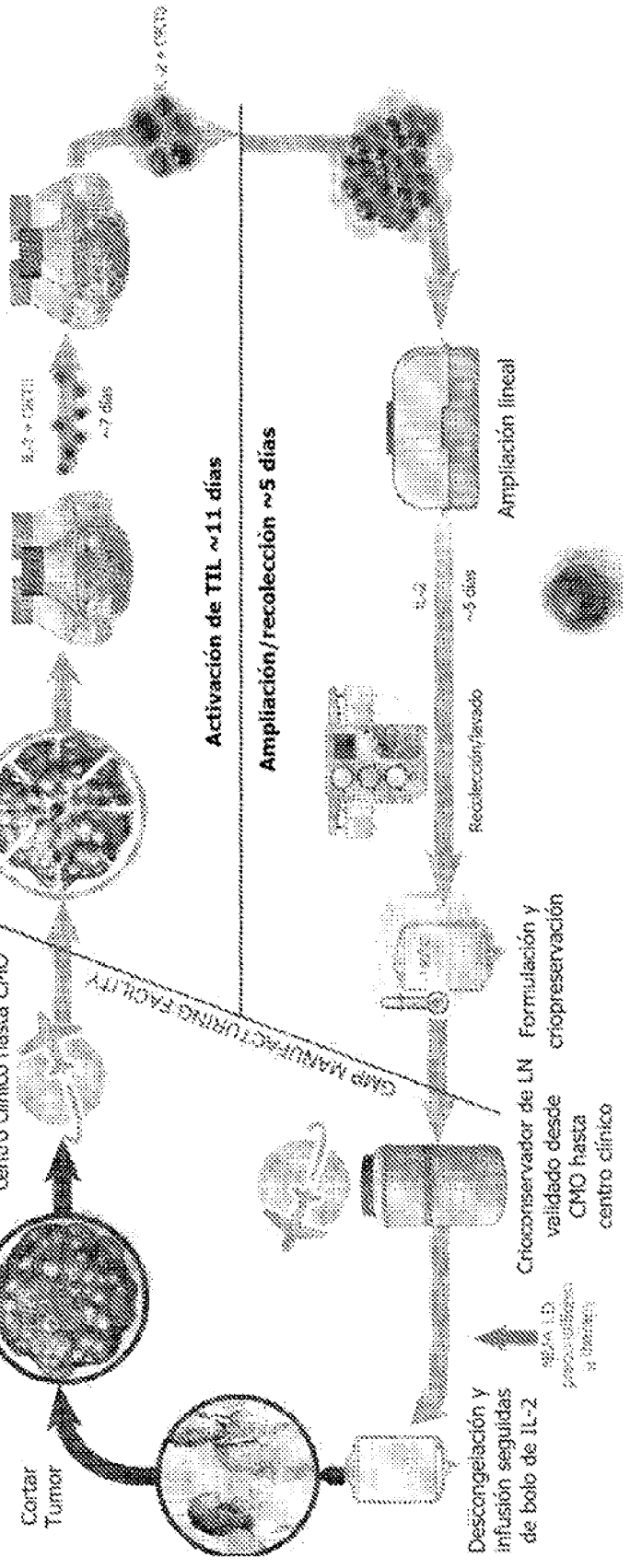

Cortar Tumor
Descongelación y infusión seguidas de bolo de IL-2
Mensajería urgente desde centro clínico hasta CMO
Criopreservador de LN validado desde CMO hasta centro clínico
Formulación y criopreservación
GMP MANUFACTURING FACILITY
Cortado en fragmentos
Cultivo primario y activación
Cultivo secundario y activación
~7 días
Activación de TIL ~11 días
Ampliación/recolección ~5 días
Recolección/lavado
~5 días
Ampliación lineal

Figura 65A

	Gen 2	Gen 3
Tiempo Total Cultivo	22 d	16-17 d
Pre-REP		
Fragmentos/matraz	≤60 fragmentos en 1 matraz	≤60 fragmentos/matraz hasta 4 matraces
Volumen medios	1L – adición única	1L – 2x adiciones 500mL
Números Pre-REP alvo	<200eG TiL	Todas las celulas llevadas a traves de un proceso continuo
Ensayo	Sin ensayo	Sin ensayo
Seleccion de matraces	Sin selección	Esterilidad bacteriana, inspección visual para detectar contaminantes
REP/aumento		
Alimentadoras		Reducido en un ≥40 %
Medios	Contiene HSAB	Definido
Aumento	Cultivo en grupo Reducir el volumen a 500 ml el día 5, dividido en 5 frascos (2500 cm2)	Frascos sellados linealmente y tratados como subcomponentes
OKT3	150 ug	≤180ug a escala máxima
IL2	Dosis alta	Dosis alta
Número de matraces	1-5	1-4
Recolección-Reducción volumen	Cerrada 10:1	Cerrada 10:1
Concentrado/Lavado	LOVO 100:1	LOVO 100:1
Formulación	1:1 CS10 (5%DMSO)	1:1 CS10 (5%DMSO)
Envío	LN Fase de vapor	LN Fase de vapor
Infusión	Descongelado gravedad IV	Descongelado gravedad IV

Figura 65B

	Gen 2	Gen 3
Tiempo Total Cultivo	22 d	16d
Pre-REP		
Fragmentos/matraz	≤60 fragmentos en 1 matraz	≤60 fragmentos/matraz hasta 4 matraces
Volumen medios	1L – adición única	1L – 2x adiciones 500mL
Números Pre-REP alvo	<200eG TIL	Todas las células llevadas a través de un proceso continuo
Ensayo	Sin ensayo	Sin ensayo
Selección de matraces	Sin selección	Esterilidad bacteriana, inspección visual para detectar contaminantes
REP/aumento		
Alimentadoras		Reducido en un ≥40 %
Medios	Contiene HSAB	Definido
Aumento	Cultivo en grupo Reducir el volumen a 500 ml el día 5, dividido en 5 frascos (2500 cm2)	Frascos sellados linealmente y tratados como subcomponentes
OKT3	150 ug	≤180ug a escala máxima
IL2	Dosis alta	Dosis alta
Número de matraces	1-5	1-4
Recolección-Reducción volumen	Cerrada 10:1	Cerrada 10:1
Concentrado/Lavado	LOVO 100:1	LOVO 100:1
Formulación	1:1 CS10 (5%DMSO)	1:1 CS10 (5%DMSO)
Envío	LN Fase de vapor	LN Fase de vapor
Infusión	Descongelado gravedad IV	Descongelado gravedad IV

Figura 66

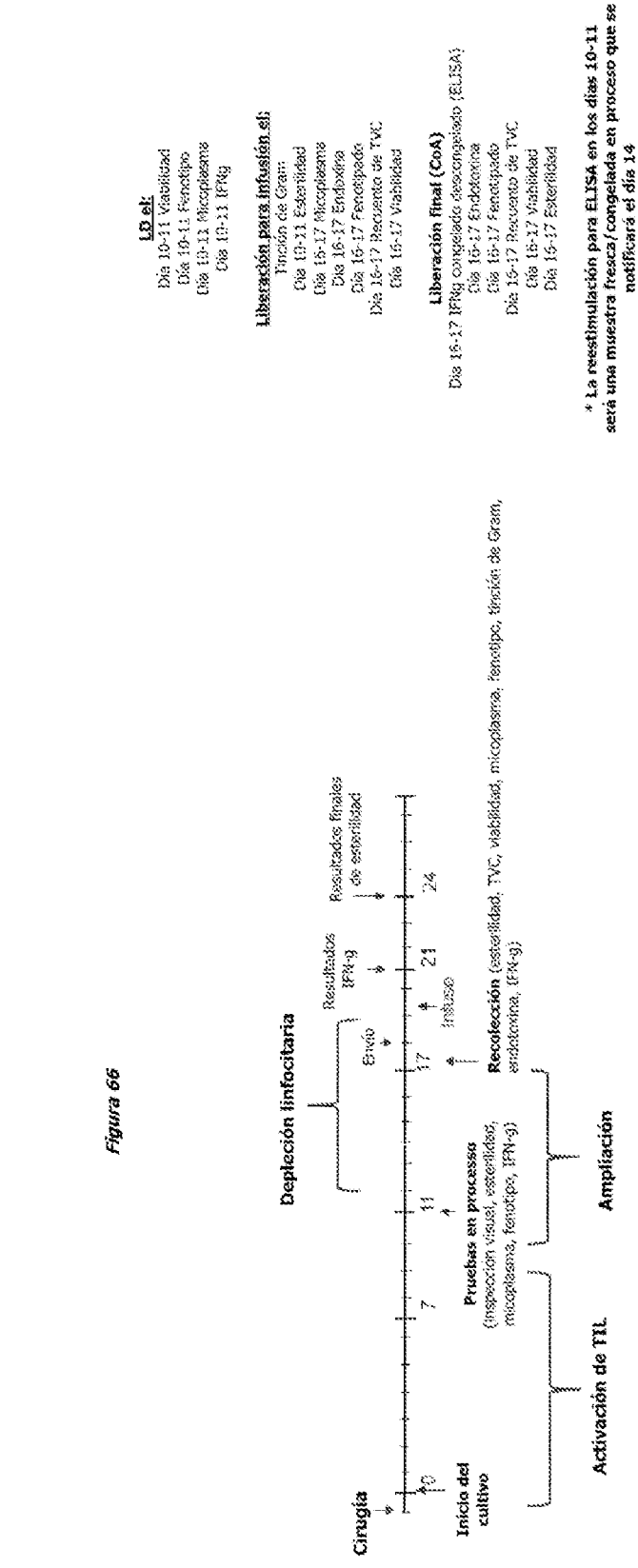

LD el:
Día 10-11 Viabilidad
Día 10-11 Fenotipo
Día 10-11 Micoplasma
Día 10-11 IFNg
Liberación para infusión el:
Tinción de Gram
Día 10-11 Esterilidad
Día 16-17 Micoplasma
Día 16-17 Endotoxina
Día 16-17 Fenotipado
Día 16-17 Recuento de TVC
Día 16-17 Viabilidad
Liberación final (CoA)
Día 16-17 IFNg congelado descongelado (ELISA)
Día 16-17 Endotoxina
Día 16-17 Fenotipado
Día 16-17 Recuento de TVC
Día 16-17 Viabilidad
Día 16-17 Esterilidad
* La reestimulación para ELISA en los días 10-11 será una muestra fresca/congelada en proceso que se notificará el día 14
Depleción linfocitaria
Resultados IFN-g
Resultados finales de esterilidad
Envío
Inicio
Cirugía
Inicio del cultivo
Pruebas en proceso (inspección visual, esterilidad, micoplasma, fenotipo, IFN-g)
Recolección (esterilidad, TVC, viabilidad, micoplasma, fenotipo, tinción de Gram, endotoxina, IFN-g)
Activación de TIL
Ampliación
0
7
11
17
21
24

Figure 67

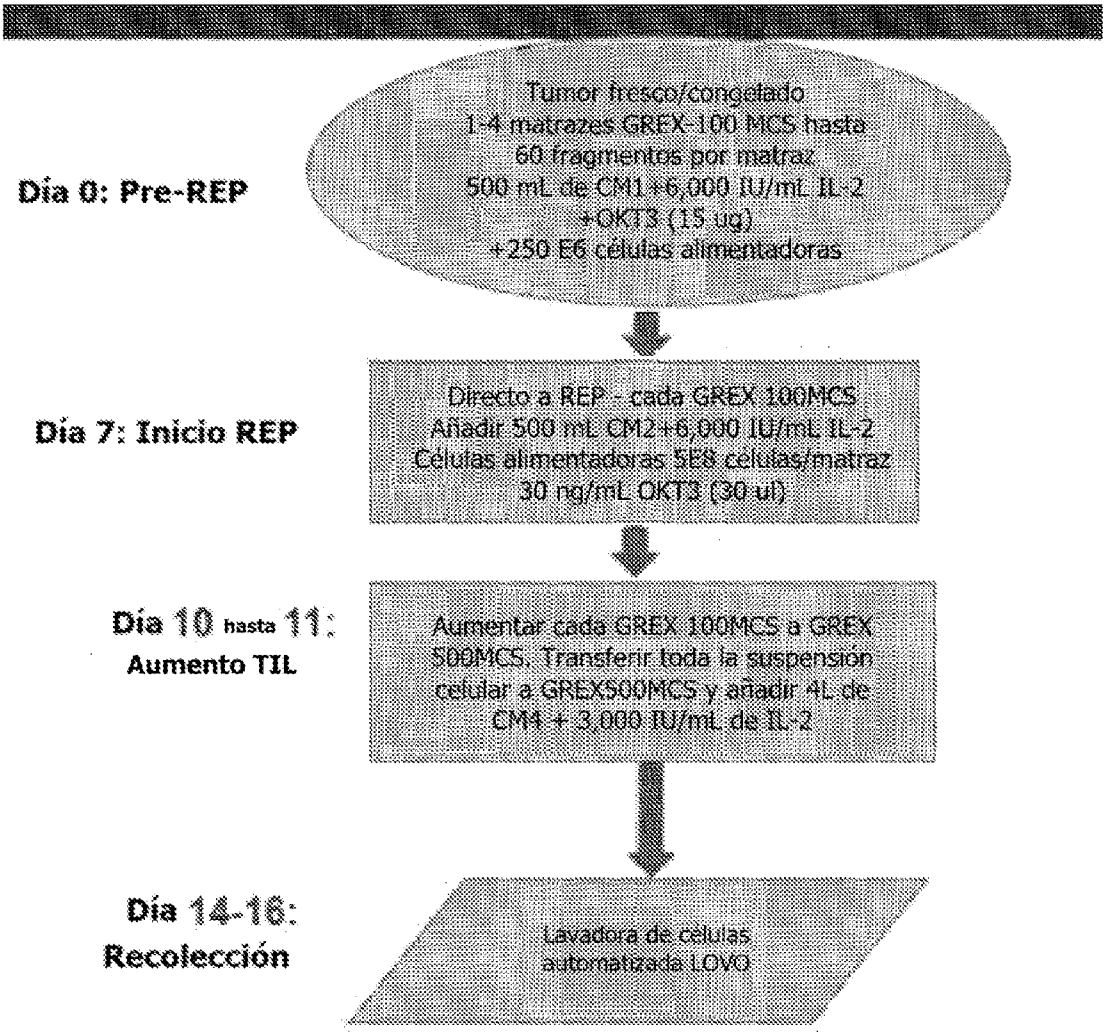

Día 0: Pre-REP
Tumor fresco/congelado
1-4 matrazes GREX-100 MCS hasta
60 fragmentos por matraz
500 mL de CM1+6,000 IU/mL IL-2
+OKT3 (15 ug)
+250 E6 células alimentadoras
Día 7: Inicio REP
Directo a REP - cada GREX 100MCS
Añadir 500 mL CM2+6,000 IU/mL IL-2
Células alimentadoras 5E8 celulas/matraz
30 ng/mL OKT3 (30 ul)
Día 10 hasta 11:
Aumento TIL
Aumentar cada GREX 100MCS a GREX
500MCS. Transferir toda la suspensión
celular a GREX500MCS y añadir 4L de
CM4 + 3,000 IU/mL de IL-2
Día 14-16:
Recolección
Lavadora de células
automatizada LOVO

Figura 68

Datos Resumen de las pruebas del día 16/17

Parámetro de prueba	10 ensayo - Día 17	20 ensayo - Día 17	30 ensayo - Día 17	Cont 2 (n=57)	
	18 Marzo 2019	18 Marzo 2019	28 Marzo 2019	Media	Mediana
Pre-LOVO TVC	17,3E+09	46,1E+09			
Pre-LOVO % Viabilidad	90,5 %	94,3%			
Post-LOVO TVC	17,8E+09	56,4E+09	48,2E+09		
Post-LOVO % Viabilidad	85,2%	90,7%	89%		
TVC Post-LOVO % Recuperación	103,5%	122,9%			
%CD45+/CD3+	88,0%	88,3%			
IFNγ (pg/mL)	11,018	19,235		10.005	9.637
Cz28 (pg/mL)	11.326	27,42		10.923	10.040
Estirilidad	Pendiente (*)	Pendiente (*)			
Endotoxina (unidades EU totales)	154,2 EU	185,9 EU			
Micoplasma	Negativo	Negativo			
Tinción de Gram	No se detectaron organismos	No se detectaron organismos			

Figura 69

**Suma hasta la muestra TIL completa (100 % vivos, CD14-, excepto monocitos)*

Características	Ensayo #1	Ensayo #2
células [redacted]	98.8	1.5
células [redacted]	0.2	0.2
células [redacted]	0.0	0.0
[redacted]	87.1	36.3
[redacted]	1.2	1.6
Total	98.4	99.6

**Suma hasta 100 % TCRab*

Características	Ensayo #1	Ensayo #2
[redacted]	0.0	0.1
[redacted]	92.2	84.4
[redacted]	7.7	15.5
[redacted]	0.1	0.1
Total	100.0	100.0

**Suma hasta 100 % vivos, CD14-*

Características	Ensayo #1	Ensayo #2
[redacted]	83.6	71.8
[redacted]	16.0	27.6
Total	99.6	99.6

Figura 70

**Suma hasta la muestra TIL completa (100 % vivos, CD14-, excepto monocitos)*

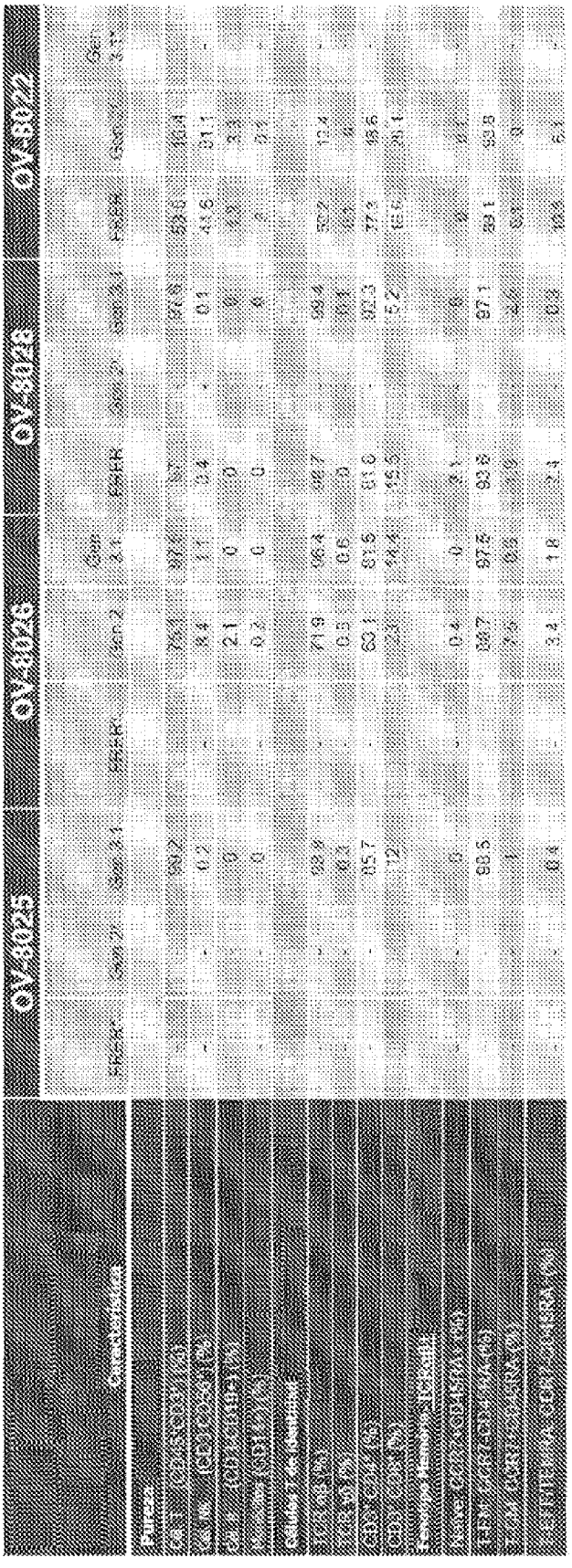
Características	Ensayo PD #1 L40063	Ensayo PD #2 L40064
CD45+ (% células vivas)	1.04	0.52
Linfocitos (% células)	0.0076	0.013
Monocitos (% células)	0.032	0.043
TCR+ (%)	85.5	96.7
TCR- (%)	2	1.36
Total	98.6	99.14

**Suma hasta 100 % TCRab*

Características	Ensayo PD #1 L40063	Ensayo PD #2 L40064
Naive CD4+ (%)	0.35	0.07
TEM CD4+ (%)	97.4	96.7
TEMRA CD4+ (%)	1.39	2.78
TH17/TH22 CD4+ (%)	0.83	0.44
Total	100.0	100.0

Características	Ensayo PD #1 L40063	Ensayo PD #2 L40064
Naive CD8+ (%)	77.5	57.4
TEMRA CD8+ (%)	16.8	36.1
Total	94.3	93.5

Figura 71



FR ER, tumor congelado, REP temprano
*Condición no probada
v, problema de muestreo, recuento de TVC bajo o células no viables al descongelarse

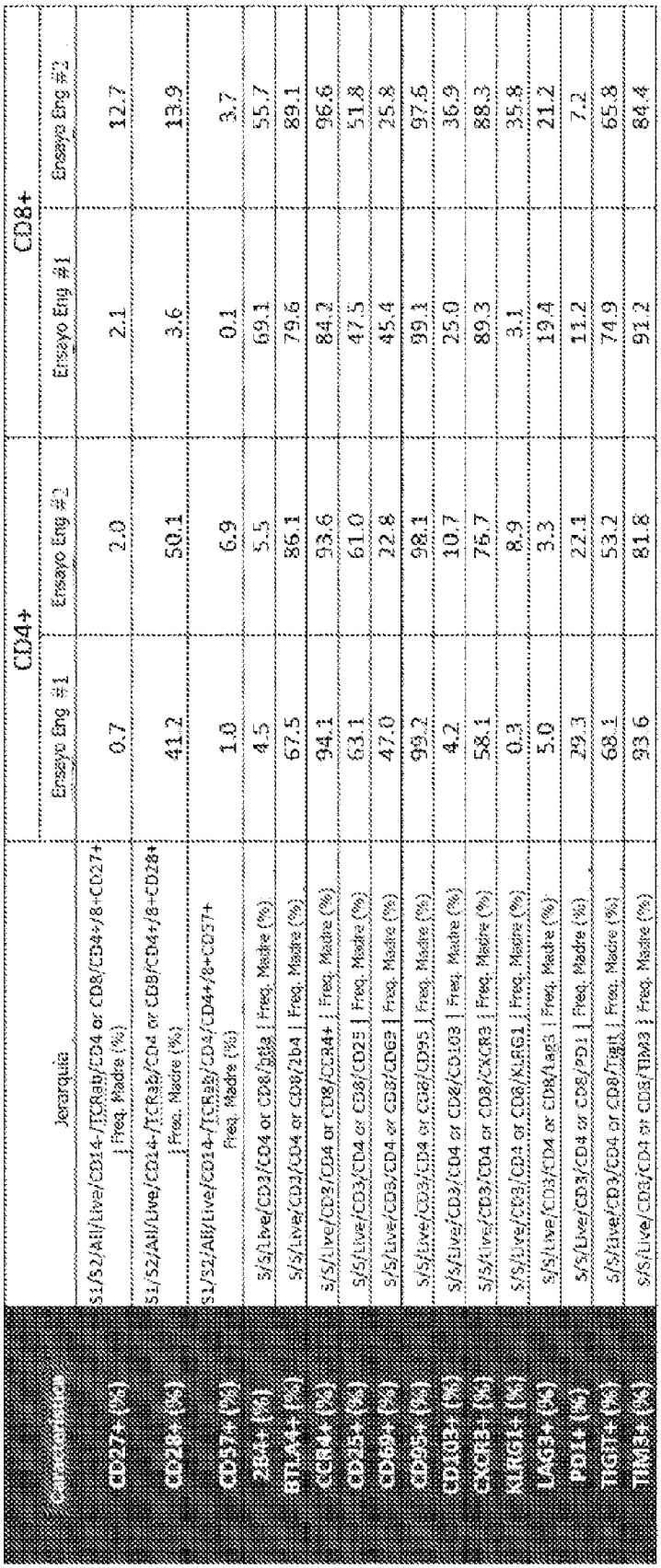
Figura 72

Características	Jerarquía	Ensayo Eng #1	Ensayo Eng #2
CD14+ (CD14+/CD3-/NK)	S1/S2/All/Live/CD14-/CD3-/NK | Freq. nulas (%)	12.9	1.5
CD19 (CD19+/CD14-)	S1/S2/All/Live/CD14-/CD19- | Freq. nulas (%)	5.2	0.2
Monocitos (CD14+)	S1/S2/All/Live/CD14+ | Freq. Madre (%)	6.6	0.0
Vivas (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab | Freq. nulas (%)	87.1	96.3
Linfo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab | Freq. nulas (%)	1.2	1.5
CD4+ (%)	S2/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4 | Freq. Madre (%)	92.5	71.9
CD8+ (%)	S3/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8 | Freq. Madre (%)	69.0	27.8
Naive CD4+CD45RA+ (%)	S2/S2/All/Live/CD14-/TCRab/Q2: CCR7+ , CD45RA+ | Freq. Madre (%)	4.0	0.1
TEM CD4+CD45RA- (%)	S2/S2/All/Live/CD14-/TCRab/Q4: CCR7- , CD45RA- | Freq. Madre (%)	92.2	34.2
TCM CD4+CD45RA- (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/Q3: CCR7+ , CD45RA- | Freq. Madre (%)	7.7	15.5
TEMRA CD4+CD45RA+ (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/Q1: CCR7- , CD45RA+ | Freq. Madre (%)	0.1	0.1
Naive CD8+CD45RA+ (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8: CD62L+ , CD45RA+ | Freq. Madre (%)	4.2	0.1
TEM CD8+CD45RA- (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8: CD62L- , CD45RA- | Freq. Madre (%)	47.7	43.5
TEMRA CD8+CD45RA+ (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/Q7: CD62L+ , CD45RA- | Freq. Madre (%)	52.1	50.4
TEM/TCM CD8+ (CD62L-)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/Q9: CD62L- , CD45RA+ | Freq. Madre (%)	0.1	0.0

**Adds up to CD3+CD45+ %*

Características	Ensayo Eng #1	Ensayo Eng #2
Beads (%)	87.1	96.3
Total (%)	1.2	1.5
WBC	38.3	87.8

Figura 73



Característica	Jerarquía	CD4+		CD8+	
		Ensayo Eng #1	Ensayo Eng #2	Ensayo Eng #1	Ensayo Eng #2
CD27+ (%)	S1/S2/Alli/Live/CD14-/TCRab/CD4 or CD8/CD4+/8+CD27+ | Freq. Madre (%)	0.7	2.0	2.1	12.7
CD28+ (%)	S1/S2/Alli/Live/CD14-/TCRab/CD4 or CD8/CD4+/8+CD28+ | Freq. Madre (%)	41.2	50.1	3.6	13.9
CD57+ (%)	S1/S2/Alli/Live/CD14-/TCRab/CD4/CD4+/8+CD57+ Freq. Madre (%)	1.8	6.9	0.1	3.7
2B4+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/2B4 | Freq. Madre (%)	4.5	5.5	69.1	55.7
BTLA+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/2b4 | Freq. Madre (%)	67.5	86.1	79.6	89.1
CCR4+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/CCR4+ | Freq. Madre (%)	94.1	93.6	84.2	96.6
CD25+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/CD25 | Freq. Madre (%)	63.1	61.0	47.5	51.8
CD69+ (%)	S/S/Live/CD8/CD4 or CD8/CD69 | Freq. Madre (%)	47.0	22.8	45.4	25.8
CD95+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/CD95 | Freq. Madre (%)	99.2	98.1	99.1	97.6
BTLA+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/CD103 | Freq. Madre (%)	4.2	10.7	25.0	36.9
CXCR3+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/CXCR3 | Freq. Madre (%)	58.1	76.7	89.3	88.3
KLRG1+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/KLRG1 | Freq. Madre (%)	0.3	8.9	3.1	35.8
LAG3+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/Lag3 | Freq. Madre (%)	5.0	3.3	19.4	21.2
PD1+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/PD1 | Freq. Madre (%)	29.3	22.1	11.2	7.2
TIGIT+ (%)	S/S/Live/CD3/CD4 or CD8/Tigit | Freq. Madre (%)	68.1	53.2	74.9	65.8
TIM3+ (%)	S/S/Live/CD8/CD4 or CD8/TIM3 | Freq. Madre (%)	93.6	81.8	91.2	84.4

Figura 74

Muestra	1:100	Est1:50	No Est	1:200	Est1:100	No Est	1:400	Est1:200	No Est	Méd	Est-No Est	Ind. Multiplic.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Eng 1 Estimulada	13201.48	16033.00	14662.24	11006.86	15254.58	12534.24	6935.83	14237.22	11668.82	13089.61	11225.97	7.42
Eng 1 No Estimulada	2192.31	2445.64	2108.37	1727.43	1982.96	1996.62	1119.067	1811.132	1158.179	1788.84		
Eng 1 Estimulada Cont.	26451.95	31766.20	31601.13	26336.05	30552.42	29752.30	26175.43	33462.43	29728.52	29579.43	10436.52	1.64
Eng 1 No Estimulada Cont.	16229.90	19478.69	16936.61	15659.69	16365.60	17883.36	15419.07	15583.43	14960.40	16292.97		

Muestra	1:100	Est1:50	No Est	1:200	Est1:100	No Est	1:400	Est1:200	No Est	Méd	Est-No Est	Ind. Multiplic.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Eng 2 Estimulada	31909.54	30235.33	33825.61	27259.20	29091.87	29452.13	29027.45	30685.94	31138.70	30271.45	27441.29	10.70
Eng 2 No Estimulada	3236.80	3442.38	3830.97	2754.12	2639.86	3892.36	2047.795	2291.364	2524.838	2830.19		
Eng 2 Estimulada Cont.	21615.93	20346.31	19425.64	16299.26	17398.91	18131.38	18825.27	18412.16	16278.94	18959.33	6189.33	1.49
Eng 2 No Estimulada Cont.	13716.23	13445.80	13573.69	12782.28	12678.27	13122.63	11898.75	11575.46	12245.29	12769.97		

Figura 75A

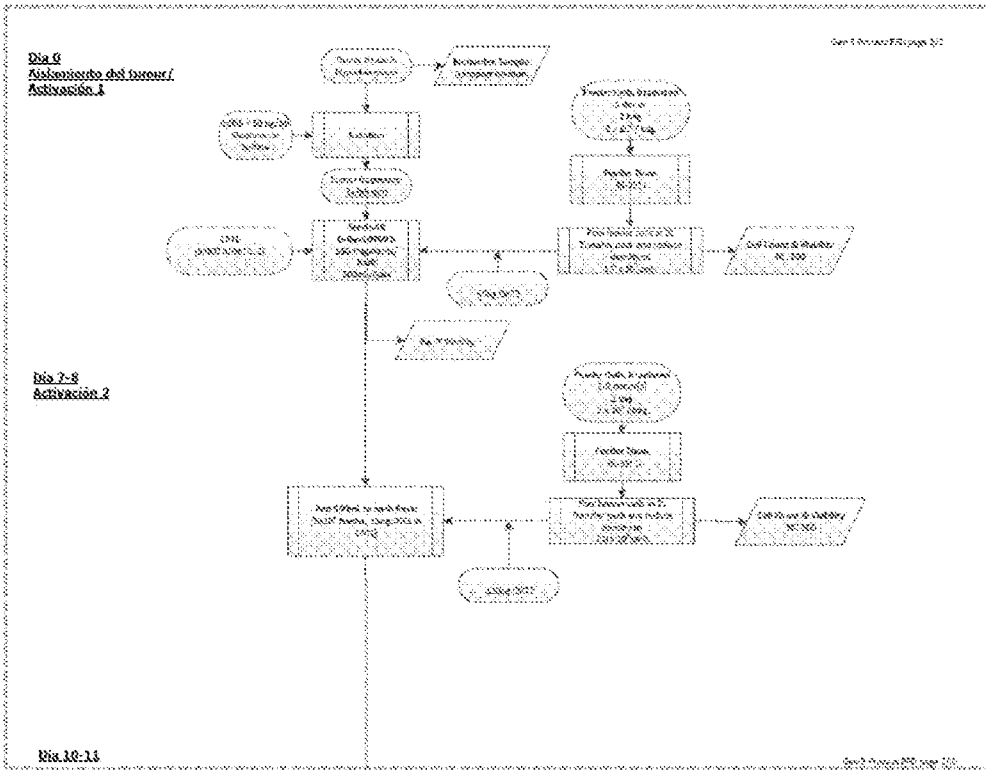


Figura 75B

(parcialmente legible)

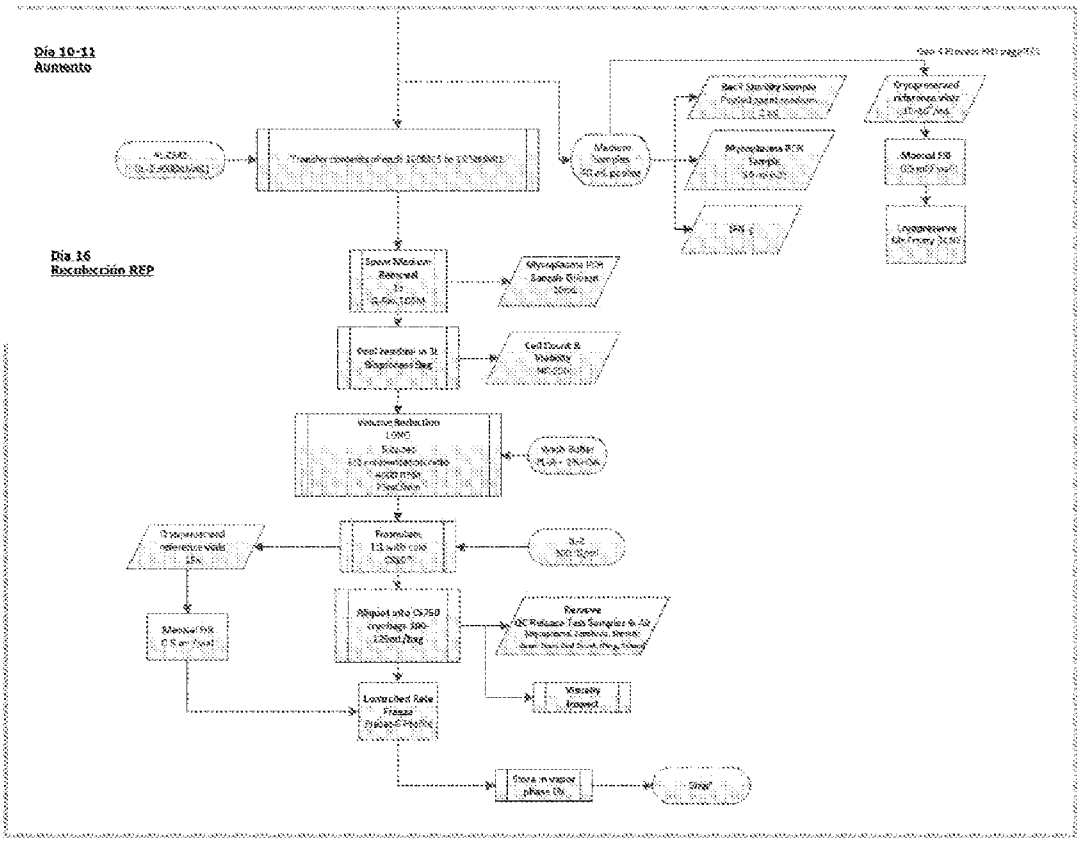


Figura 76

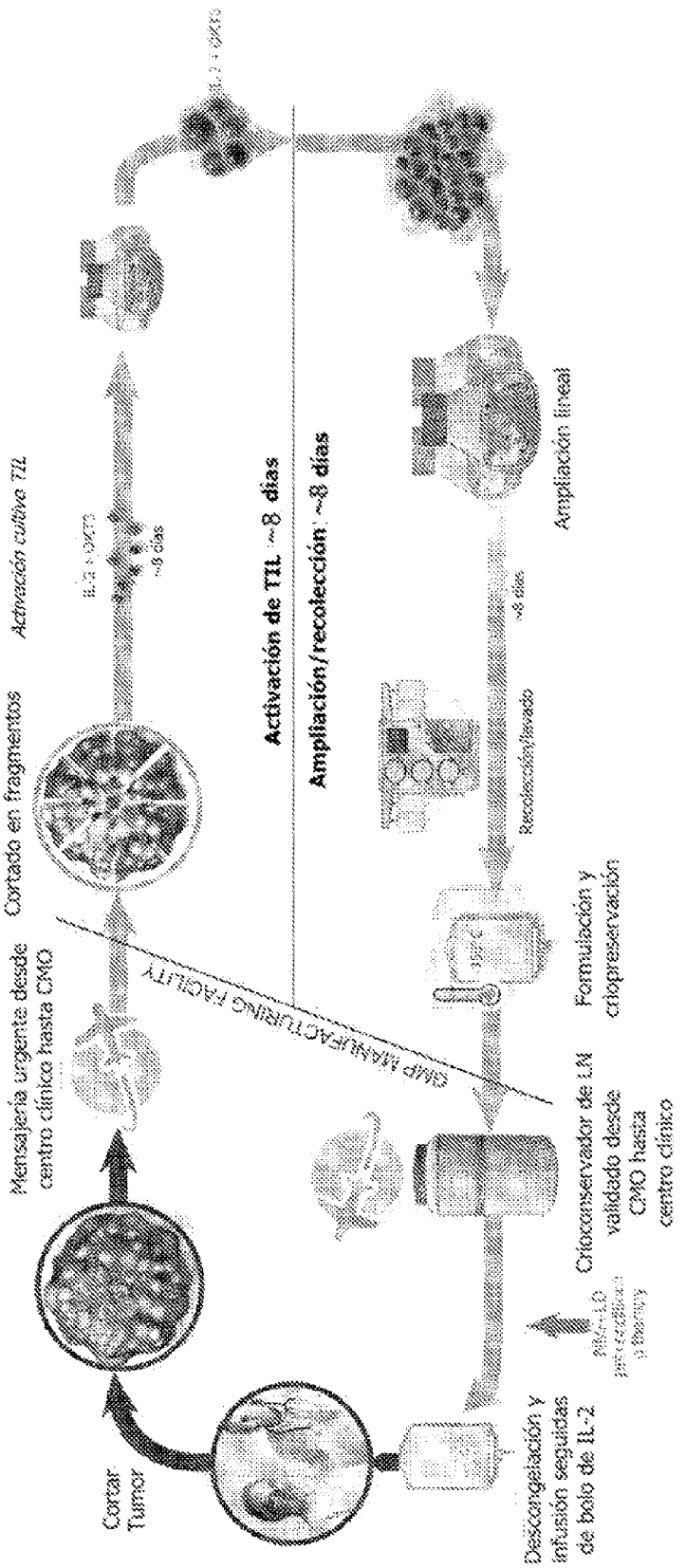

Activación de TIL ~8 días
Ampliación/recolección ~8 días
GMP MANUFACTURING FACILITY
Cortar Tumor
Mensajería urgente desde centro clínico hasta CMO
Cortado en fragmentos
Activación cultivo TIL
Ampliación lineal
Recolección/lavado
Formulación y criopreservación
Criioconservador de LN validado desde CMO hasta centro clínico
Descongelación Y infusión seguidas de bolo de IL-2

Figura 77

ETAPA	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
Pre-REP **Día 0**	<50 fragmentos/ 1 G-Rex 100MCS – 11 días	< 180 fragmentos 3 G-Rex Medio calentado CMT preformulado 100MCS-11 days	*Tumor fresco o congelado* Tumor completo con ≤ 30 fragmentos hasta 60 fragmentos por 1 G-Rex. 100MCS (hasta 4 G-Rex) *medio preformulado calentado - 7 días,* Pre-REP, alimentadores 250e6 células + OKT-3 (15 ug)
Inicio REP	Directo a REP- Día 11 <200 EG TIL 1 G-Rex 500MCS	Directo a REP- Día 11 <200 EG TIL Medio calentado CM2 preformulado hecho en uno G-Rex-500MCS	Directo a REP - Día 7 - todas las células TIL - mismo G-Rex 100MCS (100MCS hasta 4 GREX), medio estándar o medio definido (sin suero) Alimentadores adicionales 500e6 células + OKT-3 (30 ug)
Propagación TIP o aumento	1 a 5 G-Rex 100MCS División día 16	2 a 5 G-Rex 500MCS Medio calentado CM2 preformulado División día 16	De suspensión TIL de transferencia GREX 100MCS a G-REX 500MCS, hasta 4 medios estándar GREX 500 MCS o medios definidos (sin suero) Aumento día 10 o 11
Recolección	Recolección día 22 LOVO: lavadora de células automatizada	Recolección día 22 LOVO: lavadora de células automatizada (5 ciclos de lavado)	Recolección día 14 o 16 LOVO: lavadora de células automatizada (5 ciclos de lavado)
Formulación final	Producto criopreservado 300 UI/mL IL-2 CS10 en Ln2 en múltiples alicuotas	Producto criopreservado 300 UI/mL IL-2 CS10 en Ln2 en múltiples alicuotas	Producto criopreservado 300 UI/mL IL-2 CS10 en Ln2 en múltiples alicuotas
Tiempo de proceso	**22 días**	**22 días**	**16 días**

Figura 78

Comparación de procesos	Cambios en los procesos	Diferencias
Gen 2 : Gen 2.1	Iniciar el proceso con dos matraces en lugar de uno Dividir la capa de alimentación de inicio REP entre 2 matraces G-Rex500MCS Preformular los medios y calentarlos antes de su uso	Posible duplicación del recuento final de células (dosis) con un mayor repertorio de TIL. Redundancia del proceso a lo largo de todo el proceso.
Gen 2.1 : Gen 3.1	Tumor fresco o congelado Proceso de 14-16 días (a partir de 22 días) Reducir la capa de alimentación total en el proceso Capa de alimentación y OKT3 presentes en el día 0 REP iniciado con fragmentos Escalas de 100MCS a 500MCS Escalas a múltiples matraces pre-REP medios estándar o medios definidos (sin suero) 100 MCS se escalan a 500 MCS Se escalan a múltiples frascos previos a la REP Medio estándar o medio definido (sin suero)	Mayor potencia Fenotipo mejorado Menor tiempo de proceso Menos pruebas de reactivos Menor variabilidad del proceso Reactivos definidos Mayor repertorio Menos impurezas (alimentador) Dosis comparable o superior

Figura 79

Día Proceso	Condiciones	Gen 3.0	Gen 3.1 control	Gen 3.1 ensayo
Día 0: Aislamiento y activación de fragmentos tumorales	Medios (*)	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	-	15 ug	15 ug
	Alimentadores	-	-	2.5E+08
Día Proceso	Condiciones	Gen 3.0	Gen 3.1 control	Gen 3.1 ensayo
Días 7-8: Reactivación del cultivo de células TIL	Medios (*)	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	30 ug	30 ug	30 ug
	Alimentadores	1 E+09	500 E+06	500E+06
	Total de alimentadores añadidos hasta el día 7	1 E+09	500 E+06	750E+06
Día Proceso	Condiciones	Gen 3.0	Gen 3.1 control	Gen 3.1 ensayo
Días 10-11: Ampliación del cultivo	De GREX 100, transferir toda la suspensión de TIL a 1 GREX 500 que contenga 4 L de medio con IL-2 (3000 UI/mL)			
Día Proceso	Condiciones	Gen 3.0	Gen 3.1 control	Gen 3.1 ensayo
Días 16-17: Recolección/Formulación	Lavadora celular automatizada LOVO y criopreservación con CS10.			

(*) Los medios pueden ser medios estándar o medios sin suero CTS.

Figura 80 (Reglble)

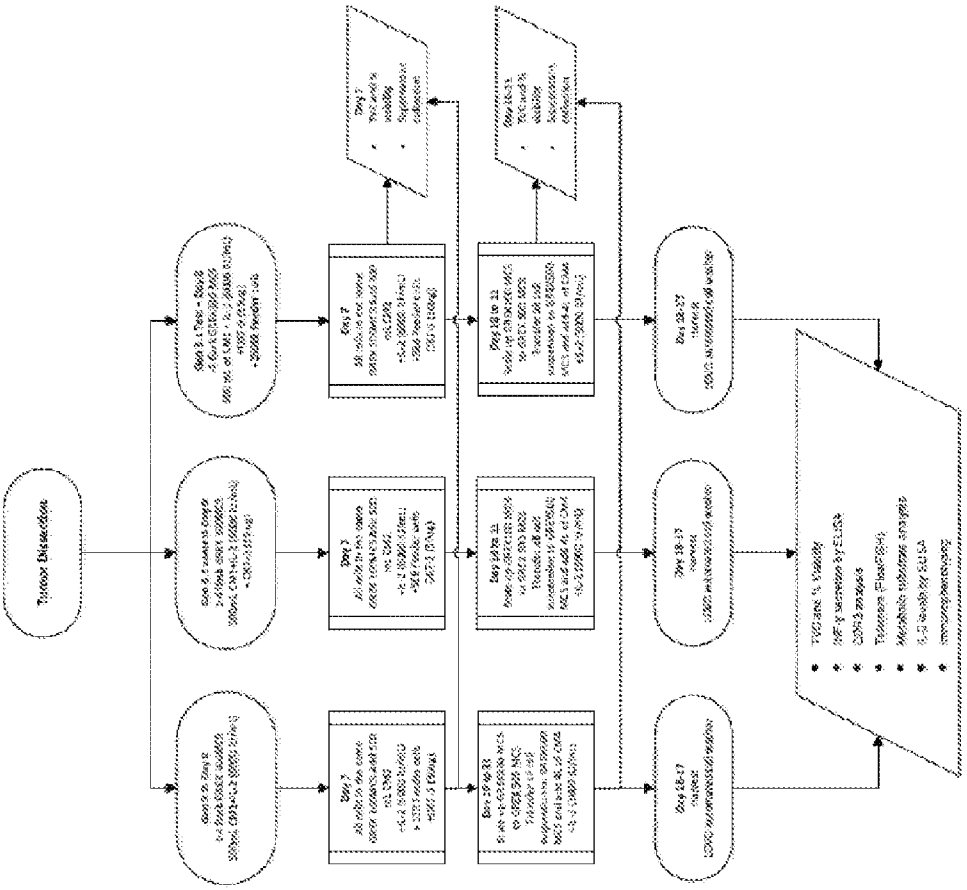


Figura 81

	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Día Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
Número de fragmentos	52	53	53	21	21	21
TVC promedio en la recolección por fragmento	1.37E+08	3.19E+08	3.53E+08	5.90E+08	7.57E+08	9.29E+08
TVC día 7 (*)	2.59E+07	6.43E+07	1.45E+08	7.35E+06	9.28E+07	1.39E+08
TVC día 10/11 (*)	6.07E+08	1.66E+09	1.83E+09	7.48E+08	1.28E+09	1.72E+09
TVC día de recolección 16/17	7.26E+09	1.69E+10	1.87E+10	1.24E+10	1.59E+10	1.95E+10
Multiplicación (día 10 u 11 /día 7)	**23.4**	**25.8**	**12.6**	**101.8**	**13.8**	**12.4**
Multiplicación (día de recolección 16/día 7)	**280.3**	**262.8**	**129.0**	**1687.1**	**171.3**	**140.3**

(*) Los recuentos celulares para el día 7 y el día 10/11 se tomaron FIO. Según el diseño del proceso, las muestras se extrajeron directamente de cada matraz después de agitar su contenido sin reducción de volumen. Como tal, el análisis y las conclusiones de los datos de recuento celular de estas muestras están limitados por la naturaleza de la metodología de muestreo.

Figura 82

	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Día Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Controlo	Día Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Controlo	Día Proceso
Reactivación	74.6%	92.1%	88.7%	88.0%	92.8%	95.0%
aumento	92.1%	95.4%	94.0%	90.4%	94.3%	95.1%
Recolección	79.5%	89.4%	94.8%	88.8%	81.9%	84.9%

Figura 83

ID Tumor	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Marcadores	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
L/D Aqua	82.2	89.4	91.0	76.6	83.1	89.5
NK	1.3	0.4	1.0	2.5	0.2	0.5
TCRb/b+	98.6	97.5	95.5	93.0	97.3	96.7
CD4	56.4	85.8	77.5	33.8	64.8	57.4
CD8/CD27	3.8	2.1	3.4	6.7	0.7	2.2
CD4/CD28	82.7	71.8	80.2	97.5	73.5	66.8
CD4/CD56	0.4	0.5	0.7	0.5	0.5	0.3
CD4/CD57	6.7	17.0	20.5	16.0	7.6	8.0
CD8	29.6	11.2	16.8	51.9	28.9	36.1
CD8/CD27	15.0	25.6	30.5	14.1	3.3	6.7
CD8/CD28	47.5	23.0	24.5	88.0	45.1	37.3
CD8/CD56	3.3	2.3	4.2	6.6	10.3	10.0
CD8/CD57	0.3	1.2	1.1	1.3	2.0	2.5

Figura 84

ID Tumor	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Marcadores	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
CD3/CD4	56.4	85.8	77.5	33.8	64.8	57.4
TEMRA of CD4	0.4	0.7	0.4	1.1	0.7	0.2
NAIVE of CD4	0.3	0.2	0.2	0.5	0.1	0.0
CM of CD4	45.6	16.8	29.3	46.3	30.6	29.9
EM of CD4	53.7	82.3	70.2	52.1	68.6	69.9
CD3/CD8	29.6	11.2	16.8	51.9	28.9	36.1
TEMRA of CD8	3.1	0.5	0.9	6.1	8.0	5.4
NAIVE of CD8	0.7	0.1	0.4	2.2	0.7	1.0
CM of CD8	22.0	15.8	29.7	61.9	18.9	18.2
EM of CD8	74.3	83.5	69.0	29.8	72.4	75.5

Figura 85

ID Tumor	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Marcadores	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
2B4+	2.1	0.6	1.0	2.0	1.2	1.3
BTLA4	99.7	95.4	96.9	99.5	98.8	98.1
CD25+	48.6	10.5	3.9	58.2	41.7	32.1
CD69+	27.1	37.7	21.5	39.4	35.6	30.5
CD95+	99.9	99.9	99.5	99.6	99.0	97.3
CD103+	0.7	1.2	0.4	1.4	1.3	1.2
KLRG1+	1.6	3.7	3.3	11.4	8.3	10.7
LAG3+	5.6	8.2	3.3	1.5	1.6	1.4
PD1+	77.4	58.4	41.6	34.1	28.4	26.7
TIGIT+	68.5	40.3	30.3	45.8	52.1	52.2
TIM3+	58.0	42.4	59.4	61.0	58.4	56.8

Figura 86

ID Tumor	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Markers	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
2B4+	65.8	56.6	70.5	13.6	21.5	20.7
BTLA+	99.5	96.6	98.2	99.3	97.4	96.1
CD25+	41.4	10.5	5.9	60.6	32.0	17.1
CD69+	44.9	28.0	28.0	33.2	30.6	22.7
CD95+	99.6	99.6	98.9	98.9	96.1	93.5
CD103+	29.4	27.9	24.5	10.9	6.0	7.3
CXCR3+	99.9	99.9	99.8	99.3	99.2	99.2
KLRG1+	7.1	4.6	6.7	13.2	14.5	14.1
LAG3+	28.6	22.5	11.9	2.8	1.6	1.4
PD1+	56.9	54.5	51.7	25.4	20.0	23.6
TIGIT+	90.8	93.7	93.3	92.1	90.4	90.5
TIM3+	66.7	49.1	58.6	65.6	46.8	43.6

Figura 87

Caracterización TIL	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
IFNγ (pg/mL)	907	428	2863	1485	3130	3863

Los resultados se comunican como la media de muestras triplicadas de un experimento representativo.

Figura 88

	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Día de Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
Reactivación	12319.6	11928.7	11786.7	5891.6	5671.8	389.4[1]
Aumento	32095.1	30368.6	26145.0	*	*	*
Recolección	17309.3	13828.4	16019.2	656.0	826.2	768.9

Los resultados se comunican como la media de muestras triplicadas de un experimento representativo.

(*) Los medios gastados a partir del día 10/11 en L4064 no se recogieron durante la ejecución de las pruebas.

(1) Los datos de la prueba L4064 de la generación 3.1 en el día de reactivación fueron significativamente inferiores a los valores correspondientes de las condiciones de control de la generación 3.1 y de la generación 3.0. Debido a la escasa cantidad de muestra tomada, no fue posible repetir el ensayo para verificar la exactitud de este número.

Figura 89

Glucosa (g/L)						
	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Día de Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
Reactivación	1.8	1.7	1.4	4.3	4.1	3.8
Aumento	1.4	0.9	0.8	*	*	*
Recolección	1.5	0.9	1.0	2.8	2.1	2.2

(*) Los medios gastados a partir del día 10/11 en L4064 no se recogieron durante la ejecución de las pruebas.

Figura 90

Lactato (g/L)	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Día de Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
Reactivación	0.2	0.2	0.5	0.1	0.2	0.5
Aumento	0.7	1.1	1.2	*	*	*
Recolección	1.1	1.7	1.6	1.5	2.0	1.9

(*) Los medios gastados a partir del día 10/11 en L4064 no se recogieron durante la ejecución de las pruebas.

Figura 91

Glutamina (mmol/L)						
	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Día de Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
Reactivación	2.0	2.0	2.0	1.3	1.2	1.1
Aumento	1.7	1.1	1.1	*	*	*
Recolección	1.9	1.3	1.3	0.7	0.6	0.6

(*) Los medios gastados a partir del día 10/11 en L4064 no se recogieron durante la ejecución de las pruebas.

Figura 92

Glutamax (mmol/L)						
	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Día de Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Controlo	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Controlo	Gen 3.1 Ensayo
Reactivación	2.2	2.2	2.2	1.4	1.3	1.2
Aúmento	1.9	1.2	1.2	*	*	*
Recolección	2.1	1.5	1.5	0,8	0,7	0,7

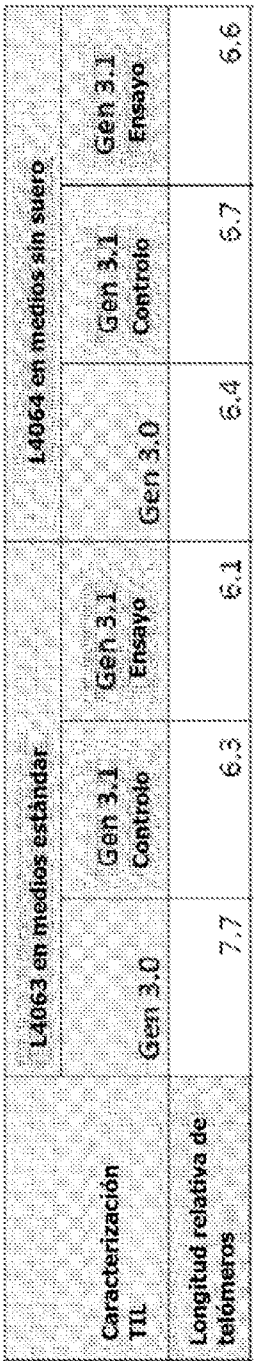
(*) Los medios gastados a partir del día 10/11 en L4064 no se recogieron durante la ejecución de las pruebas.

Figura 93

Amonio (mmol/L)						
	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
Día de Proceso	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
Reactivación	1.9	1.9	2.0	0.7	0.8	0.9
Aumento	1.8	2.2	2.3	*	*	*
Recolección	2.1	2.5	2.5	1.0	1.0	0.9

(*) Los medios gastados a partir del día 10/11 en L4064 no se recogieron durante la ejecución de las pruebas.

Figura 94



	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
		Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo		Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
Caracterización TIL	Gen 3.0			Gen 3.0		
Longitud relativa de telómeros	7.7	6.3	6.1	6.4	5.7	6.6

Figura 93

Caracterización TIL	L4063 en medios estándar			L4064 en medios sin suero		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
UCD3	14005.0	18149.0	17181.0	15107.0	21460.0	21503.0
Índice de entropía de Shannon	5.9	10.8	10.5	8.5	10.7	10.4

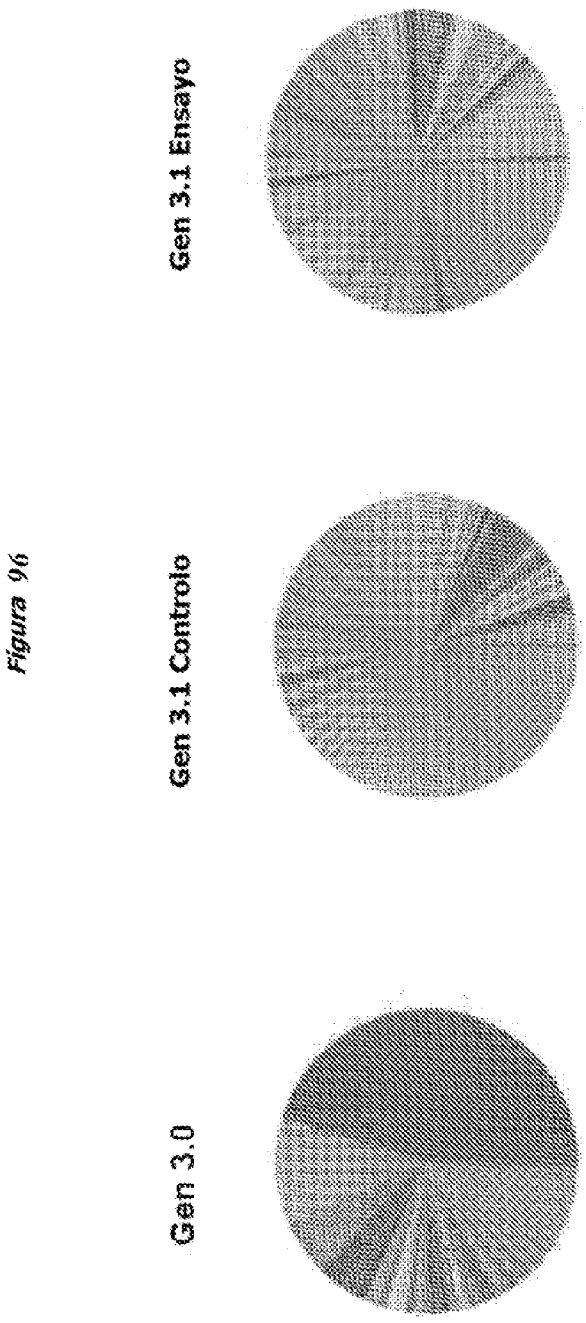


Figura 96

Figura 97

Número de uCDR3 (% solapamento) L4063	Todas uCDR3			Top 80% uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Control o	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control o	Gen 3.1 Ensayo
Gen 3.0	14005	3240 (23%)	2959 (21%)	1104	1000 (90 %)	975 (88%)
Gen 3.1 Control o	-	18149	-	-	2437	-
Gen 3.1 Ensayo	-	-	17181	-	-	2331

Figura 98

Número de uCDR3 (% solapamiento) L4064	Todas uCDR3			Top 80% uCDR3			
	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo	Gen 3.0	Gen 3.1 Control	Gen 3.1 Ensayo
Gen 3.0	15107	5486 (36%)	5541 (36%)	2478	2186 (88%)	2163 (87%)
Gen 3.1 Control	-	21460	-	-	3246	-
Gen 3.1 Ensayo	-	-	21503	-	-	3263

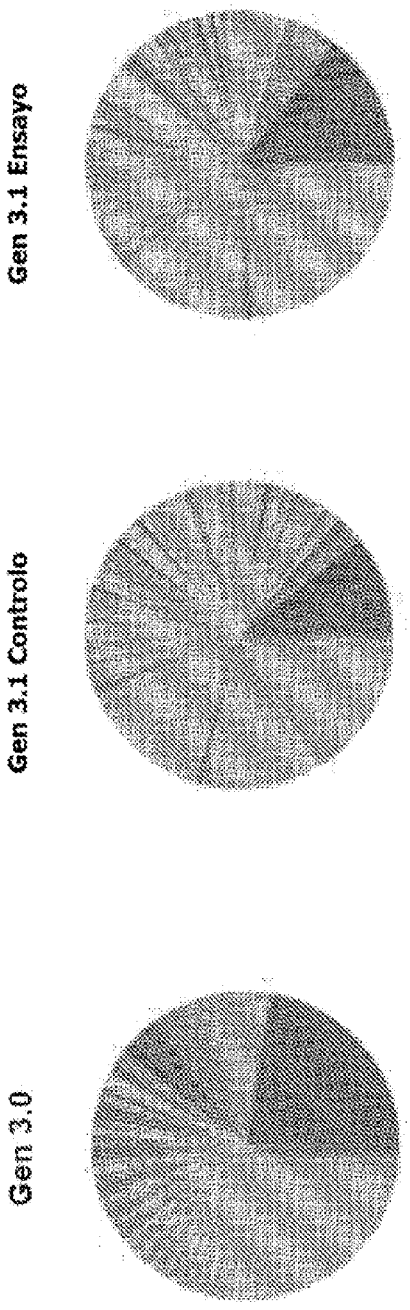


Figura 99

Figura 100

Etapa	Proceso Gen 3 Optimizado
Día 0 **Aislamiento del tumor** **y activación**	≤240 fragmentos ≤60 fragmentos/matraz ≤4 matrazes ≤2 L medios (500mL/matraz) IL-2 (6000IU/mL) $2.5x10^8$ células alimentadoras/matraz 15ug OKT3/matraz
Días 7-8 **Reactivación**	TIL fresco directo a REP Activar todo el cultivo $5x10^6$ células alimentadoras 30 ug OKT3/matraz G-Rex 100MCS Añadir 500 ml de medio + IL-2 (6000 UI/ml)/matraz
Días 10-11 **Ampliación o subcultivo de TIL**	≤4 G-REX 500MCS Ampliar todo el cultivo transfiriendo 1 l de GREX 100MCS a 500MCS y añadir 4 l de medio + IL-2 (3000 UI/ml)/matraz
Días 16-17 **Recolección**	Recolección Lavadora de células automatizada LOVO Criopreservación en Plasmalyte 1 % HSA: CS10

Figura 101

Prueba	Criterios de aceptación	Prueba Gen 3.1 vs. proceso Gen 3.0
Recuento celular (TVC)	Gen 3.1 > 30% a Proceso Gen 3.0	Cumplido
% Viabilidad	≥70 % Viabilidad	Cumplido
Inmunofenotipado (%CD3+/ %CD45+)	≤5% diferencia entre Proceso Gen 3.1 y Gen 3.0	Cumplido
Secreción de IFNγ	Gen 3.1 ≥ a Proceso Gen 3.0	Cumplido

Figura 102

Recuento de células - Día de reactivación

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio (células/mL)	Células totales Volumen promedio
Gen 3.0 (A) L4063	500	Total	7.10E+04	6.81E+04		6.96E+04	3.48E+07
		Vivas	5.27E+04	5.09E+04		5.18E+04	2.59E+07
		Muertas	1.83E+04	1.72E+04		1.78E+04	8.88E+06
		% Viabilidad	74.30%	74.80%		74.55%	
Gen 3.1 Control L4063	500	Total	1.41E+05	1.38E+05		1.40E+05	6.98E+07
		Vivas	1.31E+05	1.26E+05		1.29E+05	6.43E+07
		Muertas	9.84E+03	1.21E+04		1.11E+04	5.49E+06
		% Viabilidad	93.00%	91.20%		92.10%	
Gen 3.1 Test L4063	500	Total	3.26E+05	3.28E+05		3.27E+05	1.64E+08
		Vivas	2.83E+05	2.95E+05		2.90E+05	1.45E+08
		Muertas	4.25E+04	3.16E+04		3.71E+04	1.85E+07
		% Viabilidad	87.00%	90.30%		88.65%	
Gen 3.0 (A) L4064	500	Total	1.59E+04	1.75E+04		1.67E+04	8.35E+06
		Vivas	1.39E+04	1.55E+04		1.47E+04	7.35E+06
		Muertas	1.98E+03	2.02E+03		2.00E+03	1.00E+06
		% Viabilidad	87.50%	88.50%		88.00%	
Gen 3.1 Control L4064	500	Total	2.02E+05	1.98E+05		2.00E+05	1.00E+08
		Vivas	1.88E+05	1.83E+05		1.86E+05	9.28E+07
		Muertas	1.38E+04	1.51E+04		1.45E+04	7.23E+06
		% Viabilidad	93.20%	92.40%		92.80%	
Gen 3.1 Test L4064	500	Total	2.70E+05	3.15E+05		2.93E+05	1.46E+08
		Vivas	2.55E+05	3.01E+05		2.78E+05	1.39E+08
		Muertas	1.51E+04	1.38E+04		1.45E+04	7.23E+06
		% Viabilidad	94.40%	95.60%		95.00%	

Figura 103

Recuento de células - Día de Aumento

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Promedio (células/mL)	Células totales Volumen promedio
Gen 3.0 (A) L4063	1000	Total	6.57E+05	6.61E+05		6.59E+05	6.59E+08
		Vivas	6.00E+05	6.14E+05		6.07E+05	6.07E+08
		Muertas	5.71E+04	4.69E+04		5.20E+04	5.20E+07
		% Viabilidad	91.30%	92.90%		92.10%	
Gen 3.1 Control L4063	1000	Total	1.66E+06	1.82E+06		1.74E+06	1.74E+09
		Vivas	1.59E+06	1.72E+06		1.66E+06	1.66E+09
		Muertas	7.17E+04	9.07E+04		8.12E+04	8.12E+07
		% Viabilidad	95.70%	95.00%		95.35%	
Gen 3.1 Test L4063	1000	Total	1.88E+06	2.00E+06		1.94E+06	1.94E+09
		Vivas	1.76E+06	1.89E+06		1.83E+06	1.83E+09
		Muertas	1.20E+05	1.15E+05		1.18E+05	1.18E+08
		% Viabilidad	93.60%	94.30%		93.95%	
Gen 3.0 (A) L4064	1000	Total	7.95E+05	8.58E+05		8.27E+05	8.27E+08
		Vivas	7.17E+05	7.78E+05		7.48E+05	7.48E+08
		Muertas	7.85E+04	8.05E+04		7.95E+04	7.95E+07
		% Viabilidad	90.10%	90.60%		90.35%	
Gen 3.1 Control L4064	1000	Total	1.38E+06	1.32E+06		1.35E+06	1.35E+09
		Vivas	1.31E+06	1.24E+06		1.28E+06	1.28E+09
		Muertas	7.20E+04	8.13E+04		7.67E+04	7.67E+07
		% Viabilidad	94.80%	93.80%		94.30%	
Gen 3.1 Test L4064	1000	Total	1.85E+06	1.76E+06		1.81E+06	1.81E+09
		Vivas	1.76E+06	1.67E+06		1.72E+06	1.72E+09
		Muertas	8.62E+04	8.95E+04		8.79E+04	8.79E+07
		% Viabilidad	95.30%	94.90%		95.10%	

Figura 104

Recuento de células - Recolección L4063

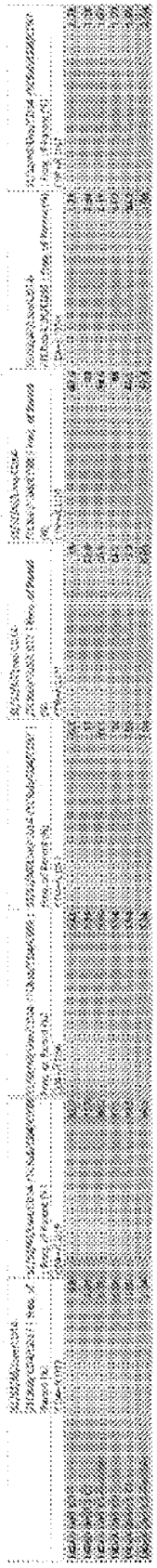
ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio (células/mL)	Células totales Volumen promedio
Gen 3.0 (A) L4063 pre LOVO	602.4	Total	1.68E+07	1.70E+07		1.69E+07	1.02E+10
		Vivas	1.52E+07	1.94E+07		1.73E+07	9.22E+09
		Muertas	1.60E+06	1.65E+06		1.63E+06	9.79E+08
		% Viabilidad	90.50%	90.30%		90.40%	
Gen 3.1 Control L4063 pre LOVO	497.1	Total	3.33E+07	3.90E+07		3.65E+07	1.81E+10
		Vivas	3.25E+07	3.73E+07		3.49E+07	1.73E+10
		Muertas	1.41E+06	1.63E+06		1.52E+06	7.56E+08
		% Viabilidad	95.80%	95.80%		95.80%	
Gen 3.1 Test L4063 pre LOVO	552.3	Total	3.71E+07	3.62E+07		3.67E+07	2.02E+10
		Vivas	3.56E+07	3.53E+07		3.54E+07	1.95E+10
		Muertas	1.50E+06	1.09E+06		1.30E+06	7.15E+08
		% Viabilidad	96.00%	97.00%		96.50%	
Gen 3.0 (A) L4063 post LOVO	165	Total	3.37E+07	3.73E+07	5.50E+07	3.53E+07	9.13E+09
		Vivas	4.32E+07	4.52E+07	4.36E+07	4.40E+07	7.26E+09
		Muertas	1.04E+07	1.21E+07	1.14E+07	1.13E+07	1.86E+09
		% Viabilidad	80.50%	78.80%	79.30%	79.53%	
Gen 3.1 Control L4063 post LOVO	165	Total	1.21E+08	1.01E+08	1.22E+08	1.15E+08	1.89E+10
		Vivas	1.10E+08	8.85E+07	1.09E+08	1.03E+08	1.69E+10
		Muertas	1.11E+07	1.23E+07	1.27E+07	1.20E+07	1.99E+09
		% Viabilidad	90.80%	87.80%	89.60%	89.43%	
Gen 3.1 Test L4063 post LOVO	175	Total	1.05E+08	1.20E+08		1.13E+08	1.97E+10
		Vivas	9.93E+07	1.14E+08		1.07E+08	1.87E+10
		Muertas	5.31E+06	6.14E+06		5.83E+06	1.02E+09
		% Viabilidad	94.70%	94.30%		94.80%	

Figura 105

Recuento de células - Recolección **L4064**

ID	Volumen (mL)		Recuento 1 (células/mL)	Recuento 2 (células/mL)	Recuento 3 (células/mL)	Promedio (células/mL)	Células totales Volumen promedio
Gen 3.0 (A) L4064 pre LOVO	641.3	Total	1.99E+07	1.94E+07		1.97E+07	1.26E+10
		Vivas	1.83E+07	1.94E+07		1.89E+07	1.21E+10
		Muertas	1.60E+06	1.63E+05		1.64E+06	1.05E+09
		% Viabilidad	92.00%	92.00%		92.00%	
Gen 3.1 Control L4064 pre LOVO	493.4	Total	3.98E+07	3.87E+07		3.93E+07	1.94E+10
		Vivas	3.65E+07	3.55E+07		3.60E+07	1.78E+10
		Muertas	3.31E+06	3.22E+06		3.27E+06	1.61E+09
		% Viabilidad	91.70%	91.70%		91.70%	
Gen 3.1 Test L4064 pre LOVO	593.4	Total	3.92E+07	3.79E+07		3.86E+07	2.29E+10
		Vivas	3.67E+07	3.54E+07		3.61E+07	2.14E+10
		Muertas	2.55E+06	2.53E+06		2.53E+06	1.50E+09
		% Viabilidad	93.50%	93.40%		93.45%	
Gen 3.0 (A) L4064 post LOVO	165	Total	8.58E+07	8.34E+07		8.46E+07	1.40E+10
		Vivas	7.56E+07	7.46E+07		7.51E+07	1.24E+10
		Muertas	1.02E+07	8.79E+06		9.50E+06	1.57E+09
		% Viabilidad	88.10%	89.50%		88.80%	
Gen 3.1 Control L4064 post LOVO	165	Total	1.13E+08	1.22E+08	1.15E+08	1.18E+08	1.94E+10
		Vivas	9.21E+07	1.01E+08	9.45E+07	9.66E+07	1.59E+10
		Muertas	2.14E+07	2.13E+07	2.07E+07	2.14E+07	3.52E+09
		% Viabilidad	81.20%	82.60%	82.10%	81.90%	
Gen 3.1 Test L4064 post LOVO	165	Total	1.33E+08	1.45E+08		1.39E+08	2.29E+10
		Vivas	1.14E+08	1.22E+08		1.18E+08	1.95E+10
		Muertas	1.94E+07	2.26E+07		2.10E+07	3.47E+09
		% Viabilidad	85.40%	84.40%		84.90%	

Figura 106



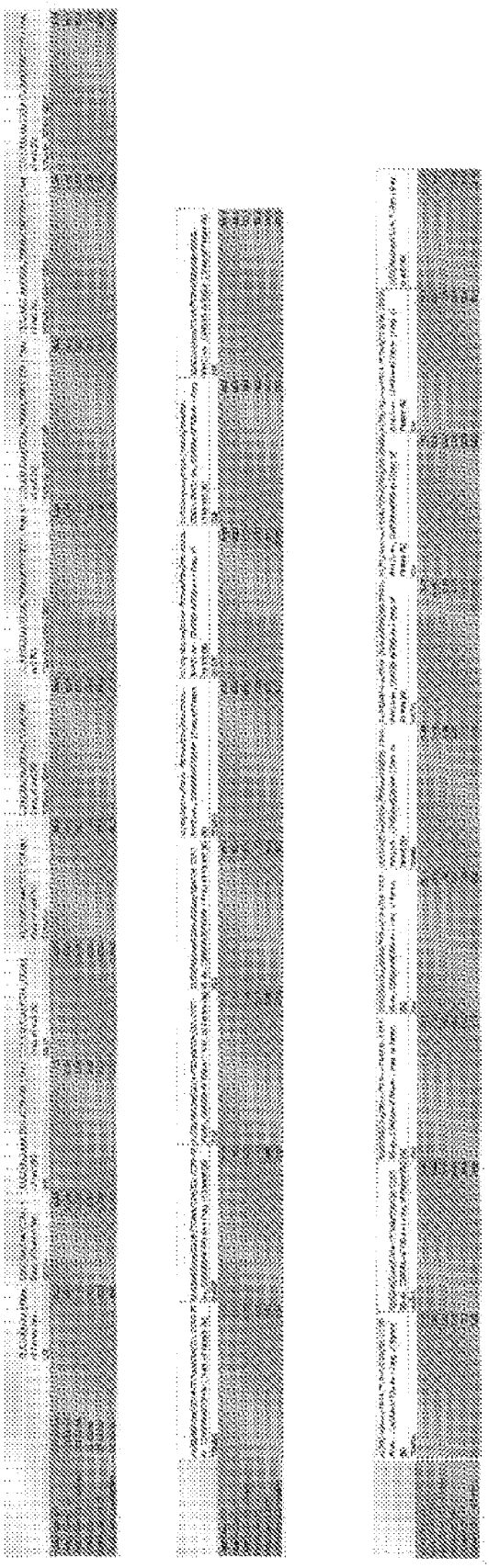


Figura 107

Figura 1108

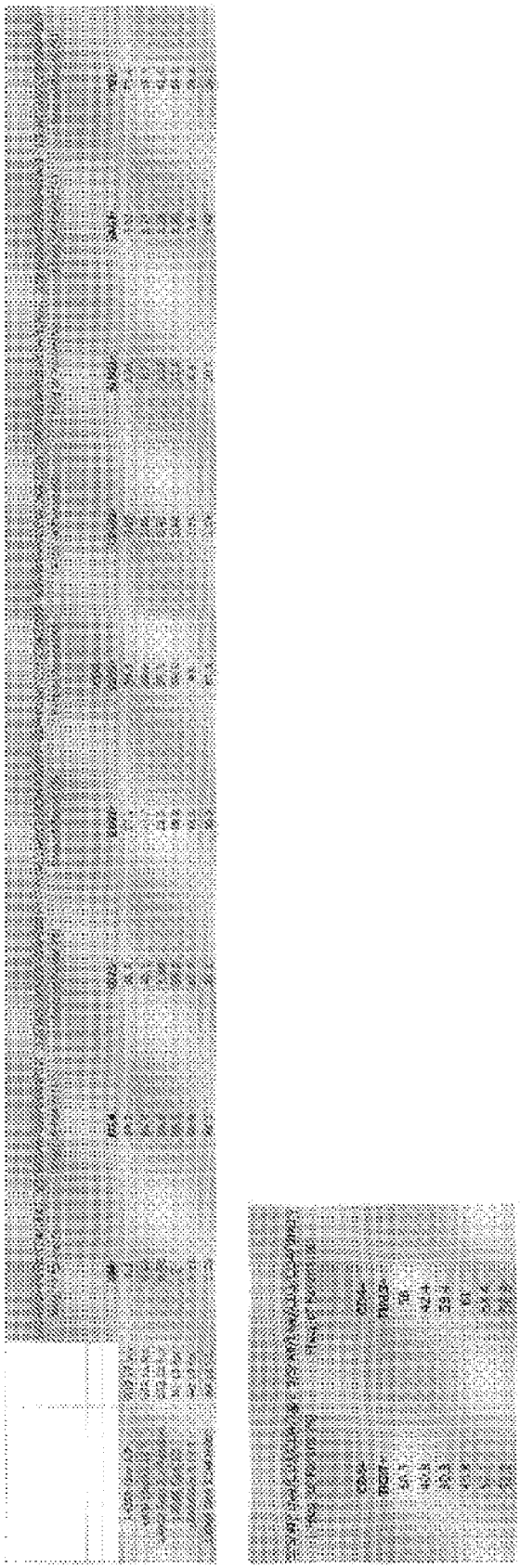


Figura 109



Figura 110

Datos producción IFN-γ Figura 7-L4063

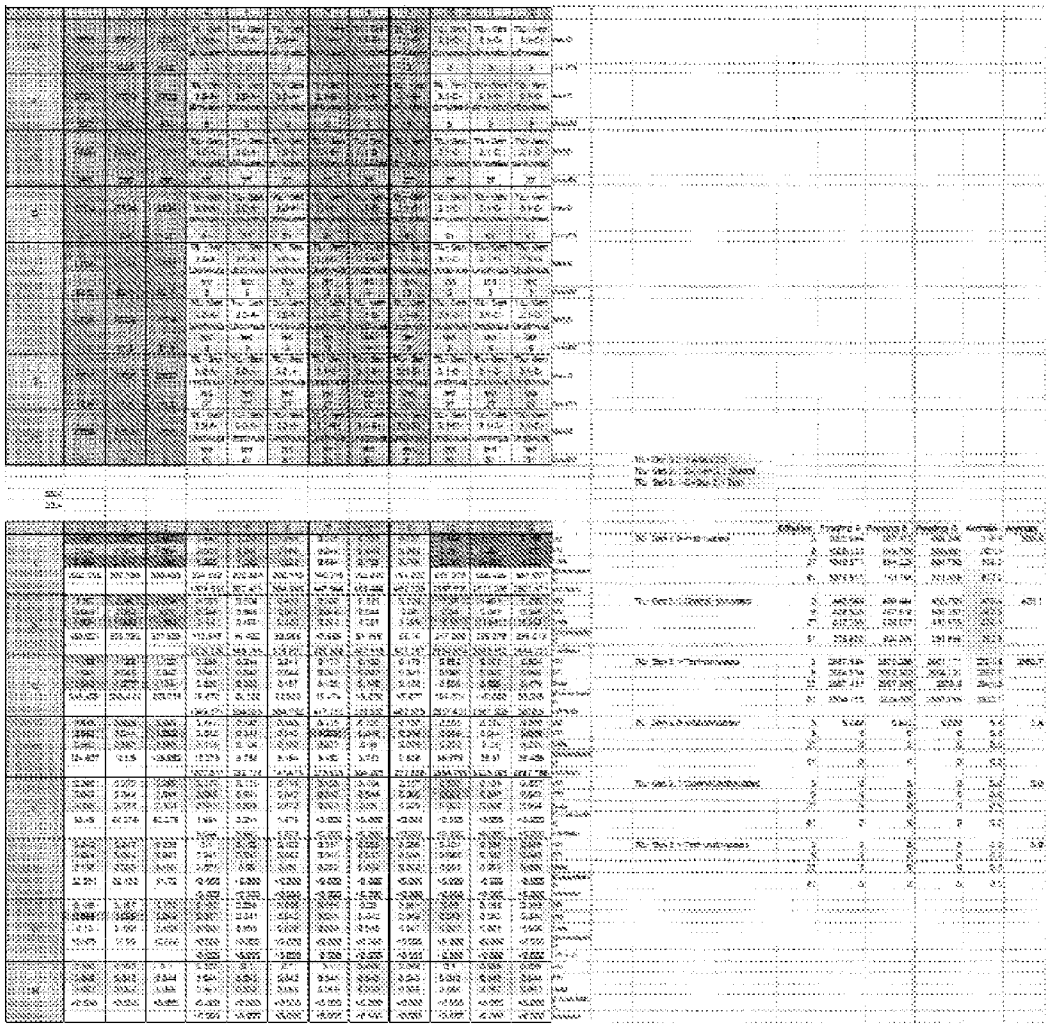


Figura 111

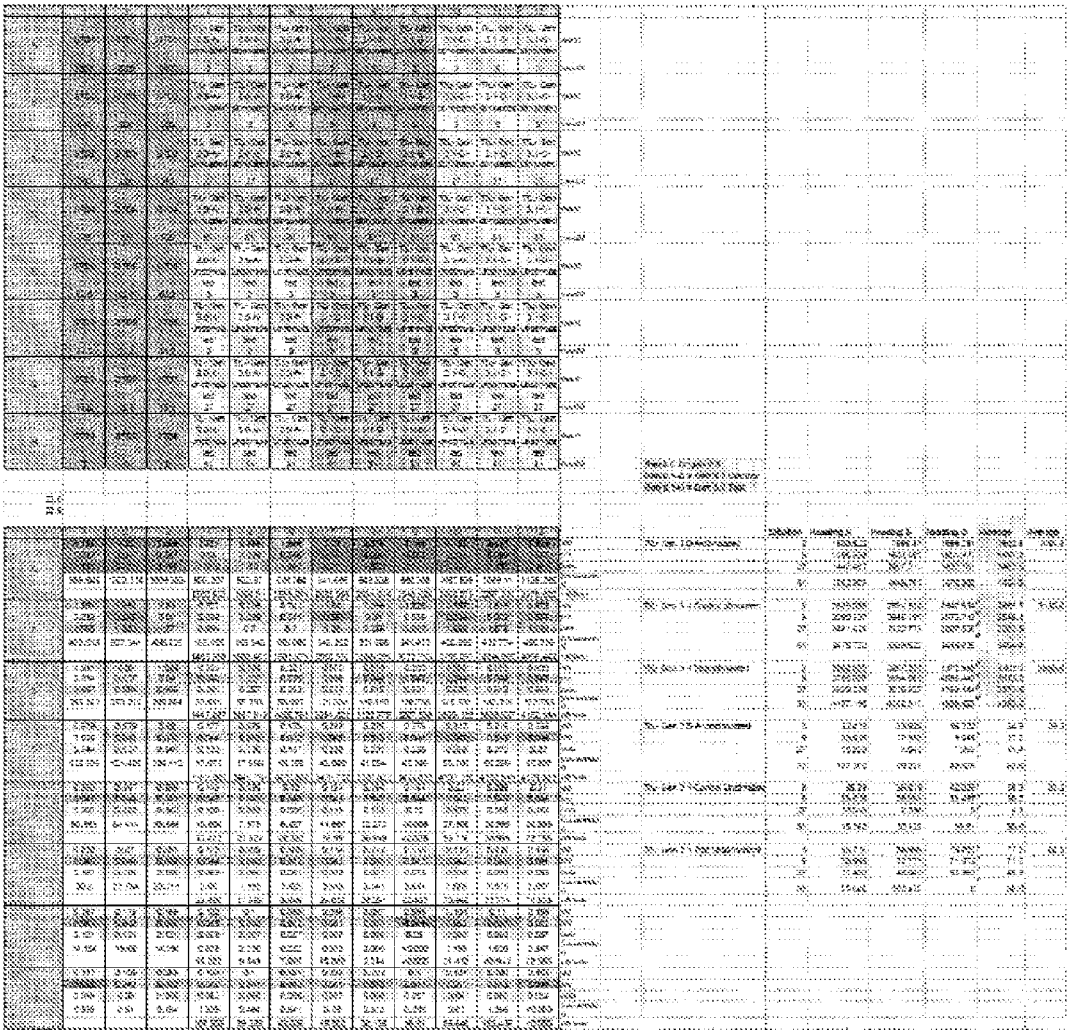


Figura 112

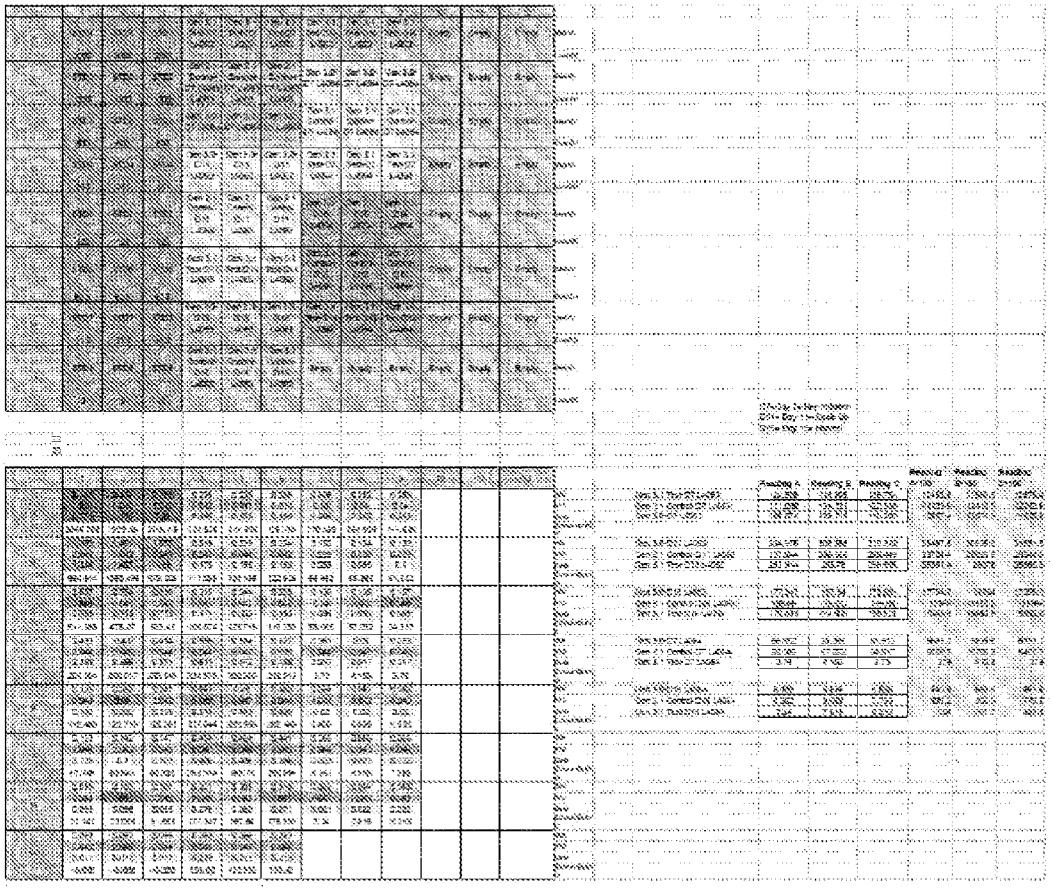
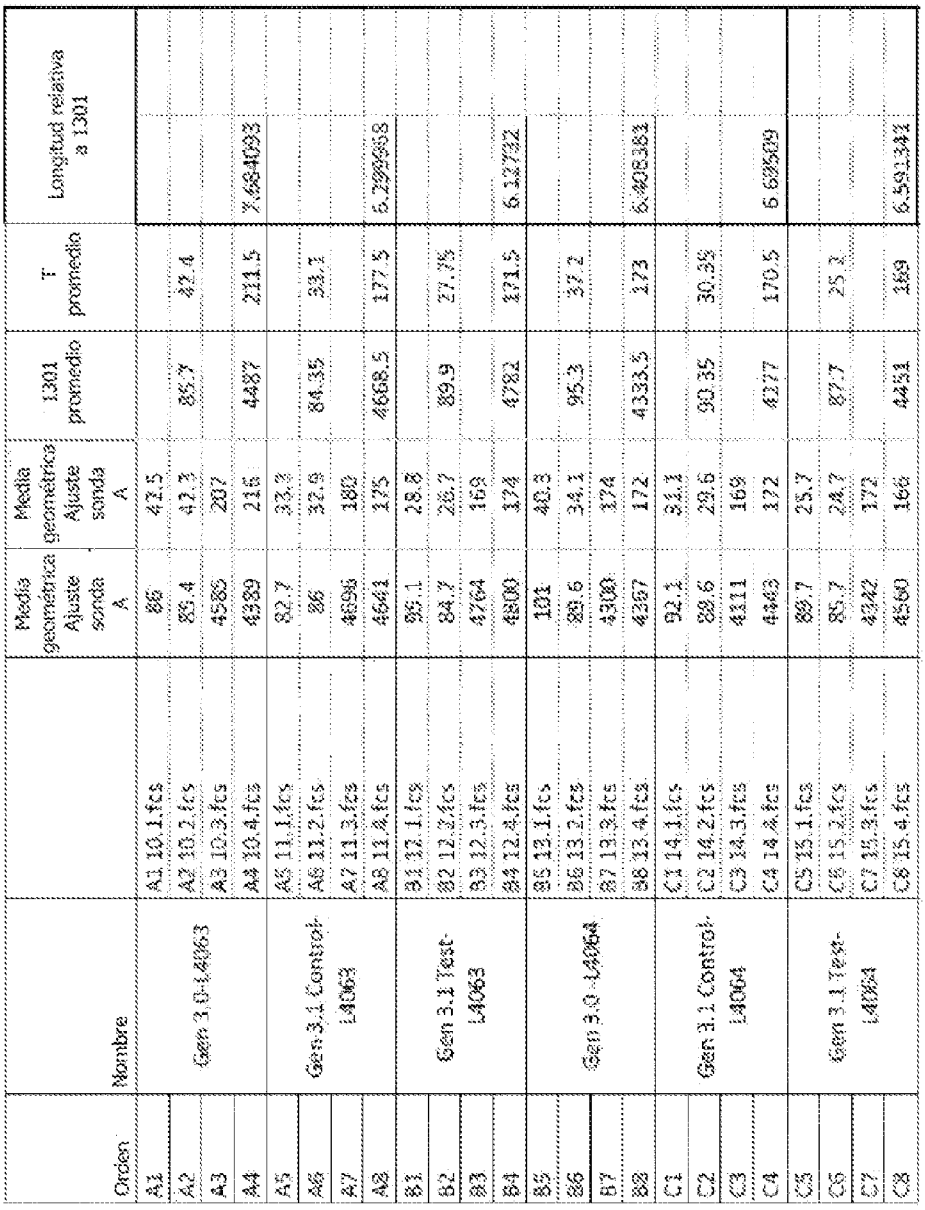


Figura 113

Núm. muestra #	Descripción Optimización Gen 3.1	Glucosa (g/l)	Lactato (g/l)	Amonio (mmol/l)	Glutamina (mmol/l)	Glutamax (mmol/l)	Glutamax-Glutamina (mmol/l)
13	Gen 3.0-Día 16 Primera Ronda #14063	1.52	1.07	2.06	1.91	2.11	0.20
14	Gen 3.1 Control-Día 16 Primera Ronda #14063	0.50	1.74	2.50	1.38	1.49	0.12
15	Gen 3.1 Ensayo-Día 16 Primera Ronda #14063	0.66	1.64	2.49	1.33	1.47	0.14
16	Gen 3.0-Día 11 Primera Ronda #14063	1.43	0.70	1.63	1.70	1.88	0.18
17	Gen 3.1 Control-Día 11 Primera Ronda #14063	0.90	1.08	2.24	1.07	1.18	0.11
18	Gen 3.1 Ensayo-Día 11 Primera Ronda #14063	0.84	1.21	2.35	1.11	1.23	0.12
19	Gen 3.0-Día 7 Primera Ronda #14063	1.75	0.20	1.85	2.04	2.23	0.19
20	Gen 3.1 Control-Día 7 Primera Ronda #14063	1.73	0.22	1.86	2.00	2.19	0.19
21	Gen 3.1 Ensayo-Día 7 Primera Ronda #14063	1.41	0.50	1.96	1.98	2.15	0.17
22	Gen 3.0-Día 16 Segunda Ronda #14064	2.76	1.52	1.80	0.68	0.77	0.09
23	Gen 3.1 Control-Día 16 Segunda Ronda #14064	2.14	1.95	0.96	0.64	0.73	0.08
24	Gen 3.1 Ensayo-Día 16 Segunda Ronda #14064	2.30	1.89	0.94	0.64	0.71	0.07
25	Gen 3.0-Día 7 Segunda Ronda #14064	4.26	0.06	0.71	1.29	1.43	0.14
26	Gen 3.1 Control-Día 7 Segunda Ronda #14064	4.14	0.22	0.76	1.17	1.30	0.13
27	Gen 3.1 Ensayo-Día 7 Segunda Ronda #14064	3.52	0.49	0.89	1.09	1.20	0.11

Figura 114



Orden	Nombre		Media geométrica Ajuste sonda A	Media geométrica Ajuste sonda A	1301 promedio	T promedio	Longitud relativa a 1301
A1	Gen 3.0-L4063	A1 10.1 fcs	86	42.5			
A2		A2 10.2 fcs	85.4	42.3	85.7	42.4	
A3		A3 10.3 fcs	4585	207			
A4		A4 10.4 fcs	4389	216	4487	211.5	7.4684093
A5	Gen 3.1 Control-L4063	A5 11.1 fcs	82.7	33.3			
A6		A6 11.2 fcs	86	32.9	84.35	33.1	
A7		A7 11.3 fcs	4696	180			
A8		A8 11.4 fcs	4641	175	4668.5	177.5	6.2995938
B1	Gen 3.1 Test-L4063	B1 12.1 fcs	95.1	28.8			
B2		B2 12.2 fcs	84.7	26.7	89.9	27.75	
B3		B3 12.3 fcs	4764	169			
B4		B4 12.4 fcs	4800	174	4782	171.5	6.327732
B5	Gen 3.0 -L4064	B5 13.1 fcs	101	40.3			
B6		B6 13.2 fcs	89.6	34.1	95.3	37.2	
B7		B7 13.3 fcs	4300	174			
B8		B8 13.4 fcs	4367	172	4333.5	173	6.4068383
C1	Gen 3.1 Control-L4064	C1 14.1 fcs	92.1	34.1			
C2		C2 14.2 fcs	88.6	29.6	90.35	30.35	
C3		C3 14.3 fcs	4111	169			
C4		C4 14.4 fcs	4443	172	4277	170.5	6.695609
C5	Gen 3.1 Test-L4064	C5 15.1 fcs	89.7	25.7			
C6		C6 15.2 fcs	85.7	24.7	87.7	25.2	
C7		C7 15.3 fcs	4342	172			
C8		C8 15.4 fcs	4560	166	4451	169	6.591341

Figura 115

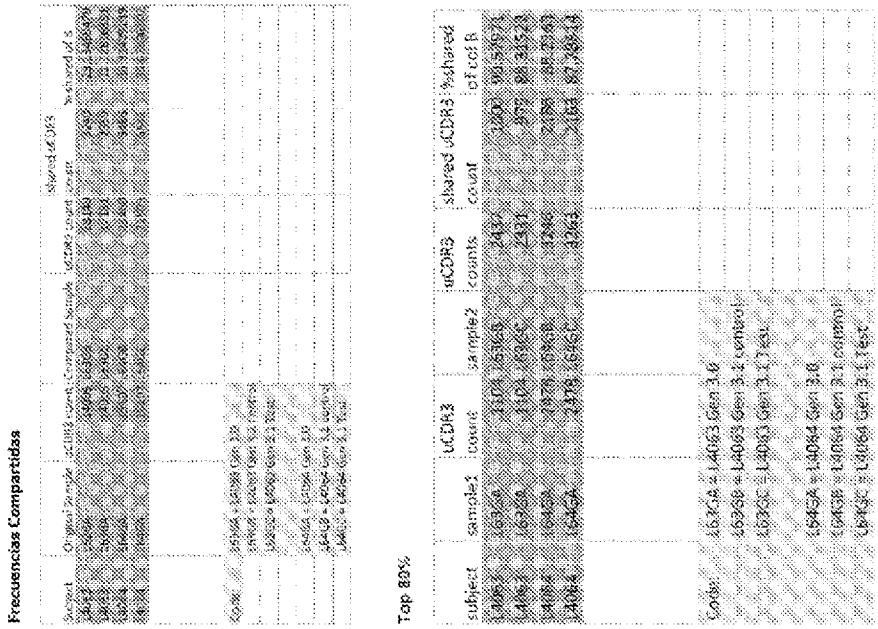
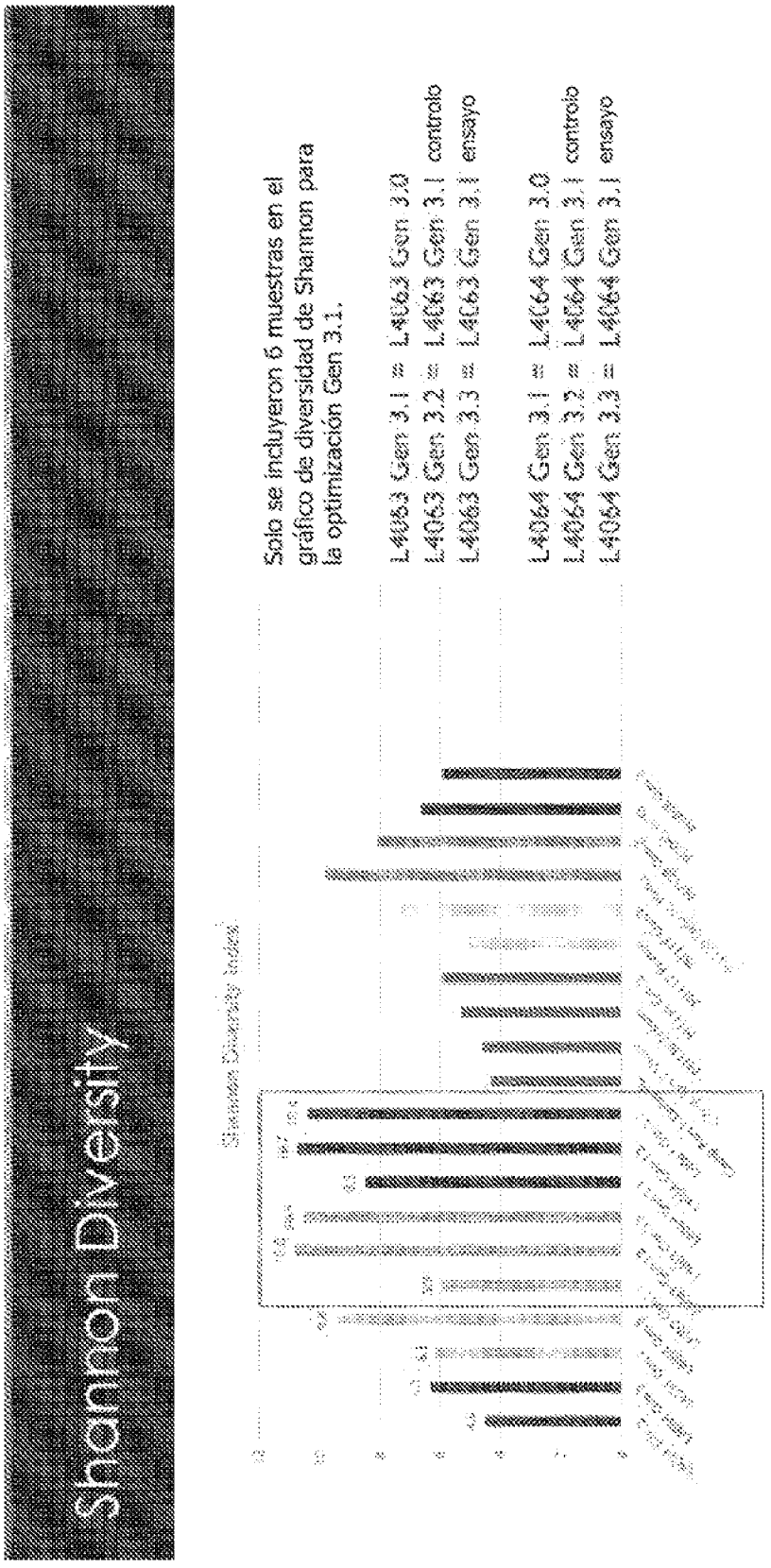


Figura 116


Shannon Diversity
Solo se incluyeron 6 muestras en el gráfico de diversidad de Shannon para la optimización Gen 3.1.
L4063 Gen 3.1 = L4063 Gen 3.0
L4063 Gen 3.2 = L4063 Gen 3.1 control
L4063 Gen 3.3 = L4063 Gen 3.1 ensayo
L4064 Gen 3.1 = L4064 Gen 3.0
L4064 Gen 3.2 = L4064 Gen 3.1 control
L4064 Gen 3.3 = L4064 Gen 3.1 ensayo