

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 469**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2020** **PCT/US2020/018711**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2020** **WO20172202**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2020** **E 20711461 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3927370**

54 Título: **Métodos para producir linfocitos T autólogos útiles para tratar cánceres y composiciones de los mismos**

30 Prioridad:

19.02.2019 US 201962807644 P

29.03.2019 US 201962826974 P

27.11.2019 US 201962941610 P

27.11.2019 US 201962941614 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2024

73 Titular/es:

TURNSTONE BIOLOGICS CORP. (100.0%)

9310 Athena Circle, Suite 300

La Jolla, CA 92037, US

72 Inventor/es:

LANGER, TIMOTHY J. y

CECCARELLI, JACOB

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 980 469 T3

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

Métodos para producir linfocitos T autólogos útiles para tratar cánceres y composiciones de los mismos

5 Campo

La presente divulgación proporciona métodos para fabricar linfocitos T. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para fabricar linfocitos T que expresan un nuevo grupo de receptores de superficie celular que reconocen péptidos en la superficie de una célula diana. La presente divulgación también proporciona poblaciones de linfocitos T producidas mediante métodos descritos en el presente documento y composiciones farmacéuticas de los mismos.

Antecedentes

15 El proceso para producir terapias con linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) autólogos para usar en el cáncer es largo, implica un número bajo de células reactivas y no es adecuado para aplicaciones comerciales. Por consiguiente, sería deseable desarrollar mejoras en el proceso de fabricación de linfocitos T para superar estas limitaciones. Se proporcionan en el presente documento realizaciones que satisfacen tales necesidades. Yossef *et al.* JCI Insight, 3 (2018) describe un método de detección mejorada de linfocitos T reactivos a neoantígenos dirigidos a oncogenes
20 únicos y compartidos para la inmunoterapia personalizada contra el cáncer.

Sumario de la invención

25 La invención se define en la reivindicación independiente. En particular, la invención proporciona un método para fabricar linfocitos T para usar en una composición celular terapéutica, en donde los linfocitos T expresan un receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un antígeno en la superficie de una célula diana, comprendiendo el método:

- a. procesar una muestra biológica que contiene una población de células linfocitos T obtenidas de un sujeto donante que tiene un tumor para producir una primera población de células linfocitos T;
- 30 b. estimular la primera población con uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para la expansión de linfocitos T en la población para producir una segunda población de linfocitos T activados en donde la estimulación se realiza en un sistema cerrado usando medio sin suero, en donde el uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante;
- 35 c. cocultivar la segunda población de linfocitos T en presencia de células presentadoras de antígeno que presentan uno o más péptidos no nativos en un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en un sistema cerrado usando medio sin suero, dichos uno o más péptidos no nativos son péptidos correspondientes a mutaciones somáticas no sinónimas asociadas en el tumor del sujeto, para producir una tercera población de células que contiene linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T endógenos reactivos a la mutación que codifica los péptidos del tumor;
- 40 d. seleccionar, de la tercera población de células, la población de linfocitos T que contiene TCR endógenos que son reactivos con los péptidos presentes en las APC basándose en uno o más marcadores de regulación positiva expresados en linfocitos T reactivos o activados en un sistema cerrado para producir una cuarta población que contiene los linfocitos T seleccionados; y
- 45 e. expandir la cuarta población de células seleccionadas en presencia de uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para expandir linfocitos T en la población en un sistema cerrado usando medio sin suero para producir una composición de linfocitos T expandidos para usar como una composición celular terapéutica, en donde el uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante.

50 Los aspectos y realizaciones preferidas adicionales de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes. Todos los aspectos, realizaciones y ejemplos de la presente divulgación que no entren en el alcance de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención y se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

Sumario de las enseñanzas técnicas

55 La información técnica que se expone más adelante puede, en algunos aspectos, ir más allá de la divulgación de la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para situar la presente invención en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Dicha información técnica adicional que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, no forma parte de la presente invención. En consecuencia, todos los aspectos, realizaciones y ejemplos de la presente divulgación que no entren en el alcance de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención y se proporcionan únicamente a título ilustrativo. La invención proporciona un método para fabricar linfocitos T para usar en una composición celular terapéutica, en donde los linfocitos T expresan un receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un antígeno en la superficie de una célula diana, comprendiendo el método: (1) procesar una muestra biológica que contiene una población de linfocitos T obtenidos de un sujeto donante que tiene un tumor para producir
60 una primera población de células linfocitos T; (2) estimular la primera población con uno o más primeros agentes

estimulantes de linfocitos T en condiciones para la expansión de linfocitos T en la población para producir una segunda población de linfocitos T activados en donde la estimulación se realiza en un sistema cerrado usando medio sin suero, en donde el uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante; (3) cocultivar la segunda población de linfocitos T en presencia de células presentadoras de antígeno que presentan uno o más péptidos no nativos en un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en un sistema cerrado usando medio sin suero, dichos uno o más péptidos no nativos son péptidos correspondientes a mutaciones somáticas no sinónimas asociadas en el tumor del sujeto, para producir una tercera población de células que contiene linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T endógenos reactivos a la mutación que codifica los péptidos del tumor; (4) seleccionar, de la tercera población de células, la población de linfocitos T que contiene TCR endógenos que son reactivos con los péptidos presentes en las APC basándose en uno o más marcadores de regulación positiva expresados en linfocitos T reactivos o activados en un sistema cerrado para producir una cuarta población que contiene los linfocitos T seleccionados; y (5) expandir la cuarta población de células seleccionadas en presencia de uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para expandir linfocitos T en la población en un sistema cerrado usando medio sin suero para producir una composición de linfocitos T expandidos para usar como una composición celular terapéutica, en donde el uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante.

El método comprende expandir los linfocitos T *in vitro*. En algunas de cualquiera de las realizaciones, las células presentadoras de antígeno son células nucleadas tales como las células dendríticas, fagocitos mononucleares, linfocitos B, células endoteliales o epitelio tímico. En algunas de cualquiera de las realizaciones, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas. En algunas de cualquiera de las realizaciones, los linfocitos T son autólogos del sujeto. En algunas de cualquiera de las realizaciones, los linfocitos T son autólogos de un sujeto que tiene un tumor. En algunas de estas realizaciones, los linfocitos T son autólogos del paciente. En algunas de cualquiera de las realizaciones, los linfocitos T se obtienen de un donante sano. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la molécula del MHC es una molécula de clase I. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la molécula del MHC es una molécula de clase II. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la molécula del MHC es de clase I y II. En algunas de las realizaciones, los linfocitos T son linfocitos CD4+. En algunas de cualquiera de las realizaciones, los linfocitos T son linfocitos CD8+. En algunas de cualquiera de las realizaciones, los linfocitos T son linfocitos CD4+ y linfocitos CD8+.

Los agentes estimulantes de linfocitos T son IL-2 recombinante y opcionalmente uno o más de un anticuerpo anti-CD3; un anticuerpo anti-CD28; o una citocina recombinante seleccionada de IL-7, IL-15 y IL-21.

Los primeros agentes estimulantes de linfocitos T son IL-2 recombinante y opcionalmente uno o más de un anticuerpo anti-CD3; un anticuerpo anti-CD28; o una citocina recombinante seleccionada de IL-7, IL-15 y IL-21. El primer agente estimulante de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la concentración de IL-2 recombinante es de 100 UI/ml a 6000 UI/ml. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la concentración de IL-2 recombinante es de 300 UI/ml a 1000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de IL-2 recombinante es de o aproximadamente 300 UI/ml.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, el agente estimulante de linfocitos T comprende además un anticuerpo anti-CD3, tal como OKT3. En algunas realizaciones, la concentración del anticuerpo anti-CD3 es de o aproximadamente 50 ng/ml. Los segundos agentes estimulantes de linfocitos T son IL-2 recombinante y opcionalmente uno o más de un anticuerpo anti-CD3; un anticuerpo anti-CD28; o una citocina recombinante seleccionada de IL-7, IL-15 y IL-21. El segundo agente estimulante de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, la concentración de IL-2 recombinante es de 100 UI/ml a 6000 UI/ml. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la concentración de IL-2 recombinante es de 300 UI/ml a 1000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de IL-2 recombinante es de o aproximadamente 300 UI/ml. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el agente estimulante de linfocitos T comprende además un anticuerpo anti-CD3, tal como OKT3. En algunas realizaciones, la concentración del anticuerpo anti-CD3 es de o aproximadamente 50 ng/ml.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más péptidos no nativos comprende un péptido individual o un grupo de péptidos. Los péptidos no nativos son péptidos correspondientes a mutaciones somáticas no sinónimas asociadas en el tumor del paciente. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el uno o más péptidos no nativos se cargan en células presentadoras de antígeno mediante transfección *in vitro* construcciones de minigenes sintetizados transcritos que codifican aminoácidos mutados somáticos no sinónimos. En algunas realizaciones, los aminoácidos mutados están flanqueados a cada lado por 12 aminoácidos de proteínas endógenas, en tándem, en donde las construcciones del minigen transcrito generan péptidos individuales. En algunas de cualquiera de las realizaciones, los péptidos no nativos se expresan en células nucleadas mediante electroporación de grupos de péptidos asociados con mutaciones somáticas no sinónimas en las células presentadoras de antígeno. En algunas realizaciones, los aminoácidos mutados están flanqueados a cada lado por 12 aminoácidos de proteínas endógenas, en tándem, en donde las construcciones del minigen transcrito generan péptidos individuales. En algunas de cualquiera de las realizaciones, los péptidos no nativos se expresan en células presentadoras de antígeno mediante la síntesis de construcciones de minigenes que codifican aminoácidos somáticos mutados no sinónimos, flanqueados a cada lado por 12 aminoácidos de proteínas endógenas en tándem, transcritos a continuación usando transcripción del ARN *in vitro* para generar péptidos individuales y después transfectarlos en células presentadoras de antígeno.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, los péptidos no nativos se expresan en células nucleadas mediante pulsación de péptidos, tales como por electroporación, de grupos de péptidos que consisten en 12 péptidos largos asociados con mutaciones somáticas no sinónimas en las células presentadoras de antígeno. En algunas de
 5 cualquiera de las realizaciones, uno o más péptidos no nativos se cargan en células presentadoras de antígeno mediante pulso peptídico. En algunas realizaciones, el pulso peptídico se realiza mediante electroporación. En algunas de cualquiera de las realizaciones, los péptidos no nativos se expresan en células nucleadas mediante pulsación de péptidos, tales como por electroporación, de grupos de péptidos asociados con mutaciones somáticas no sinónimas en las células presentadoras de antígeno. En algunos casos, cada péptido del grupo de péptidos tiene de 9 a 15
 10 aminoácidos de longitud, tal como o aproximadamente 9 aminoácidos, 10 aminoácidos, 11 aminoácidos, 12 aminoácidos, 13 aminoácidos, 14 aminoácidos o 15 aminoácidos de longitud. En algunos casos, cada péptido de los grupos de péptidos es un péptido de 12 aminoácidos de longitud. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más péptidos no nativos tiene entre 5-30 aminoácidos. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más péptidos no nativos tiene entre 12-25 aminoácidos. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más
 15 péptidos no nativos tiene o aproximadamente tiene 25 aminoácidos o tiene o aproximadamente tiene 12 aminoácidos.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, la proporción entre grupos de péptidos y células presentadoras de antígeno durante la pulsación de péptidos (por ejemplo, electroporación) está entre 0,001 y 100 µg por 1 millón de células, entre 0,01 y 100 µg por 1 millón de células, entre 0,1 y 100 µg por 1 millón de células, entre 1 y 100 µg por 1
 20 millón de células, entre 10 y 100 µg por 1 millón de células.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, la concentración de grupos de péptidos para la pulsación (por ejemplo, electroporación) está entre o aproximadamente 0,001 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre 0,01 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre o aproximadamente 0,1 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre o
 25 aproximadamente 1 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre o aproximadamente 0,01 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml o entre o aproximadamente 1 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml.

En algunas realizaciones, la concentración de péptidos individuales para el pulso peptídico está entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml, entre o
 30 aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml o entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la proporción entre péptidos individuales y células presentadoras de antígeno durante la pulsación de péptidos (por ejemplo, electroporación) está entre 0,001 y 100 µg por 1 millón de células, entre 0,01 y 100 µg por 1 millón de células, entre 0,1 y 100 µg por 1 millón de células, entre 1 y 100 µg por 1 millón de células, entre 10 y 100 µg por 1 millón de células. En algunas realizaciones, la concentración entre péptidos individuales para el pulso peptídico está entre o
 35 aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml o entre o aproximadamente 0,001 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de péptidos individuales para la pulsación de péptidos (por ejemplo, electroporación) está entre o aproximadamente 0,01 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre o aproximadamente 0,1 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre o aproximadamente 1 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre o aproximadamente 0,01 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml o entre o aproximadamente 1 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de péptidos individuales para el pulso peptídico está entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml, o entre o
 40 aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,001 µg/ml.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, los péptidos no nativos se derivan de proteínas endosómicas o lisosomales. En algunas de cualquiera de las realizaciones, los péptidos no nativos se derivan de proteínas citosólicas.
 50

En algunas de cualquiera de las realizaciones, la proporción de cocultivo entre células presentadoras de antígeno y linfocitos T está entre 20:1 y 1:1, entre 15:1 y 1:1, entre 10:1 y 1:1, entre 5:1 y 1:1, entre 2,5:1 y 1:1.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, la proporción de cocultivo entre células presentadoras de antígeno y linfocitos T está entre 20:1 y 1:1, entre 15:1 y 1:1, entre 10:1 y 1:1, entre 5:1 y 1:1, o entre 2,5:1 y 1:1. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la proporción de cocultivo entre células presentadoras de antígeno y linfocitos T es o es aproximadamente 1:1.
 55

En algunas de cualquiera de las realizaciones, la separación de células presentadoras de antígeno se realiza mediante separación magnética, separación gravimétrica, unión selectiva o clasificación de células mediante citometría de flujo.
 60

En el presente documento se proporciona un método para fabricar linfocitos T para usar en una composición celular terapéutica, en donde los linfocitos T expresan un receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un antígeno en la superficie de una célula diana: (a) procesar una muestra biológica que contiene una población de células linfocitos T obtenidas de un sujeto donante que tiene un tumor para producir una primera población de células linfocitos T; (b)
 65

estimular la primera población con uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para la expansión de linfocitos T en la población para producir una segunda población de linfocitos T activados, en donde el uno o más agentes estimulantes de linfocitos T es o incluye IL-2 recombinante a una concentración de 300 UI/ml a 1000 UI/ml y en donde la estimulación se realiza en un sistema cerrado usando medio sin suero; (c) cocultivar la segunda población de linfocitos T en presencia de células dendríticas autólogas cargadas con uno o más péptidos no nativos para presentar uno o más péptidos no nativos en un complejo principal de histocompatibilidad (MHC), en donde el cocultivo se realiza en un sistema cerrado usando medio sin suero y en donde el uno o más péptidos no nativos son péptidos correspondientes a mutaciones somáticas no sinónimas asociadas en el tumor del sujeto y se cargan con las células dendríticas en una concentración de menos de 0,02 µg/ml por péptido individual, para producir una tercera población de células que contiene linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T endógenos reactivos a la mutación que codifica los péptidos del tumor; (d) seleccionar, de la tercera población de células, la población de linfocitos T que contiene TCR endógenos que son reactivos con los péptidos presentes en las APC basándose en uno o más marcadores de regulación positiva expresados en linfocitos T reactivos o activados en un sistema cerrado para producir una cuarta población que contiene los linfocitos T seleccionados; y (e) expandir la cuarta población de células seleccionadas en presencia de uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para expandir los linfocitos T en la población, en donde el uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T es o incluye IL-2 recombinante a una concentración de 300 UI/ml a 1000 UI/ml y en donde la expansión se realiza en un sistema cerrado usando medio sin suero para producir una composición de linfocitos T expandidos para usar como una composición celular terapéutica.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, la concentración de cada péptido individual del uno o más péptidos no nativos es 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la concentración de cada péptido individual del uno o más péptidos no nativos es 0,0001 µg/ml y 0,001 µg/ml. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más péptidos no nativos comprende un péptido individual o un grupo de péptidos individuales. En algunas de cualquiera de las realizaciones, cada uno del uno o más péptidos no nativos tiene una longitud de 12 a 25 aminoácidos. En algunas realizaciones, el uno o más péptidos no nativos tiene una longitud de aproximadamente 25 aminoácidos. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, la proporción de cocultivo entre células dendríticas y linfocitos T está entre 5:1 y 1:5 o está entre 3:1 y 1:3. En algunas realizaciones, la proporción de cocultivo es o es aproximadamente 1:1. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, la proporción de cocultivo entre células dendríticas y linfocitos T es o es aproximadamente 1:1. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el cocultivo dura de 2 horas a 24 horas. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el cocultivo dura aproximadamente 6 horas.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, la selección se realiza utilizando un clasificador de células basado en fluorescencia. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la selección se realiza utilizando un clasificador de células basado en fluorescencia en un sistema cerrado utilizando un medio sin suero. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la selección se realiza en 1 ronda, 2 rondas, 3 rondas o 4 rondas mediante el clasificador de células basado en fluorescencia. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la selección se realiza a una tasa de entre 10.000 y 100.000 células/segundo utilizando un clasificador de células microfluídicas basado en fluorescencia desechable. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el sistema cerrado es un sistema de bolsa.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, los marcadores de regulación positiva son proteínas expresadas en la superficie de los linfocitos T que solo se expresan cuando el TCR endógeno de los linfocitos T reconoce un péptido expresado por las APC.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva se seleccionan del grupo que consiste en CD107, CD107a, CD39, CD103, CD137 (4-1BB), CD59, CD69, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134 (OX40), CD258, CD256, PD-1, TIM-3 y LAG-3. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva se selecciona del grupo que consiste en CD38, CD39, CD6, CD90, CD134 y CD137. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva es CD134 y/o CD137. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva se selecciona del grupo que consiste en CD107, CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134, CD258 y CD256. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T se selecciona del grupo que consiste en CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90 y CD38. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T comprende al menos dos marcadores seleccionados de CD107a y CD39, CD107a y CD103, CD107a y CD59, CD107a y CD90, CD107a y CD38, CD39 y CD103, CD39 y CD59, CD39 y CD90, CD39 y CD38, CD103 y CD59, CD103 y CD90, CD103 y CD38, CD59 y CD90, CD59 y CD38 y CD90 y CD38. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T comprende además CD137. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T comprende al menos dos marcadores seleccionados de CD107a y CD137, CD38 y CD137, CD103 y CD137, CD59 y CD137, CD90 y CD137 y CD38 y CD137. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el uno o más marcadores de regulación positiva comprende además al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en PD-1, TIM-3 y LAG-3.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, la estimulación de la primera población es de 7 a 21 días. En algunas realizaciones, la estimulación de la primera población es de 7 a 14 días. En algunas de cualquiera de las realizaciones

proporcionadas, la expansión de la cuarta población es de 7 a 21 días. En algunas realizaciones, la expansión de la cuarta población es de 7 a 14 días.

5 En algunas de cualquiera de las realizaciones, el tiempo desde el procesamiento de las muestras biológicas que contienen la población de linfocitos hasta la producción de linfocitos T expandidos es inferior a 30 días. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el tiempo desde el enriquecimiento de la población de linfocitos hasta la producción de linfocitos T expandidos es inferior a 30 días. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la población de linfocitos de la muestra biológica proviene de linfocitos infiltrantes de tumor, linfocitos linfáticos o células mononucleares de sangre periférica. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la población de linfocitos de la muestra biológica se deriva de linfocitos infiltrantes de tumor, linfocitos linfáticos o células mononucleares de sangre periférica.

15 En algunas de cualquiera de las realizaciones, el tumor es un tumor de un cáncer epitelial. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el tumor es un tumor de un melanoma, escamoso del pulmón, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer esofágico, cáncer colorrectal (CRC), cáncer de cuello de útero, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago o cáncer de útero. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el tumor es un tumor de un cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), CRC, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer colangiocarcinoma, cáncer de endometrio, opcionalmente en donde el cáncer de mama es cáncer de mama HR+/Her2-, cáncer de mama triple negativo (TNBC) o cáncer de mama HER2+.

20 En algunas de cualquiera de las realizaciones, la población de linfocitos se procesa a partir de un tumor resecado, como fragmentos de tumor del tumor resecado. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el tumor es un melanoma.

25 En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, la población de linfocitos se procesa como una suspensión de células individuales obtenidas por homogeneización y/o digestión enzimática de uno o más fragmentos de tumor de un tumor resecado. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, la población de linfocitos se procesa como una suspensión de células individuales obtenidas por homogeneización y digestión enzimática de uno o más fragmentos de tumor de un tumor resecado. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la digestión enzimática es mediante una colagenasa. En algunas realizaciones, la colagenasa es una colagenasa tipo IV. En algunas realizaciones, la colagenasa es una colagenasa tipo I/II. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el cáncer es cáncer colorrectal (CRC).

35 En algunas de cualquiera de las realizaciones, la composición de células expandidas se utiliza para tratar a un paciente con cáncer.

40 En algunas de cualquiera de las realizaciones, el método comprende además recoger células producidas mediante el método. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el método comprende además formular las células recogidas con un crioprotector.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, la población de linfocitos T de la composición terapéutica producida mediante el método expresa más de o igual a 1 receptor de superficie de linfocitos T que reconoce más de o igual a 1 antígeno específico en una célula diana que expresa mutaciones no sinónimas.

45 En algunas de cualquiera de las realizaciones, la población de linfocitos T de la composición terapéutica producida mediante el método está enriquecida en linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de regulación positiva de linfocitos T expresados en linfocitos T reactivos o activados en comparación con la primera población de linfocitos T, como, por ejemplo, enriquecida de 10 a 1000 veces. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la población de linfocitos T de la composición terapéutica producida mediante el método está enriquecida en linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de regulación positiva de linfocitos T expresados en linfocitos T reactivos o activados en comparación con la segunda población de linfocitos T, como, por ejemplo, enriquecida de 10 a 1000 veces. En algunas de cualquiera de las realizaciones, la población de linfocitos T de la composición terapéutica producida mediante el método está enriquecida en linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de regulación positiva de linfocitos T expresados en linfocitos T reactivos o activados en comparación con la tercera población de linfocitos T, como por ejemplo enriquecida de 1,5 a 50 veces.

60 En algunas de cualquiera de las realizaciones, la población de linfocitos T de la composición terapéutica producida mediante el método es capaz de producir IFN γ a una concentración superior a o aproximadamente 30 pg/ml después de la estimulación específica del antígeno. En algunas realizaciones, el IFN γ producido después de la estimulación específica de antígeno es superior a o aproximadamente 40 pg/ml, superior a o aproximadamente 50 pg/ml, superior a o aproximadamente 60 pg/ml, superior a o aproximadamente 70 pg/ml, superior a o aproximadamente 80 pg/ml o superior a o aproximadamente 90 pg/ml.

65 También describimos una población de linfocitos T producida mediante cualquiera de los métodos proporcionados en donde la población de linfocitos T expresa más de o igual a 1 receptor de superficie de linfocitos T que reconoce más

de o igual a 1 antígeno específico en una célula diana que expresa mutaciones no sinónimas.

En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la población de linfocitos T producida mediante los métodos proporcionados está enriquecida en linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de regulación positiva de linfocitos T expresados en linfocitos T reactivos o activados en comparación con la primera población de linfocitos T, como, por ejemplo, enriquecida de 10 a 1000 veces. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la población de linfocitos T producida mediante los métodos proporcionados está enriquecida en linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de regulación positiva de linfocitos T expresados en linfocitos T reactivos o activados en comparación con la segunda población de linfocitos T, como, por ejemplo, enriquecida de 10 a 1000 veces. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la población de linfocitos T producida mediante los métodos proporcionados está enriquecida en linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de regulación positiva de linfocitos T expresados en linfocitos T reactivos o activados en comparación con la tercera población de linfocitos T, como por ejemplo enriquecida de 1,5 a 50 veces.

En algunas de cualquiera de las divulgaciones proporcionadas, la población de linfocitos T producida mediante los métodos proporcionados es capaz de producir IFN γ a una concentración superior a o aproximadamente 30 pg/ml, tal como superior a o aproximadamente 60 pg/ml, después de una estimulación específica del antígeno. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la población de linfocitos T producida mediante el método es capaz de producir IFN γ a una concentración superior a o aproximadamente 30 pg/ml después de la estimulación específica de antígeno. En algunas divulgaciones, el IFN γ producido después de la estimulación específica de antígeno es superior a o aproximadamente 40 pg/ml, superior a o aproximadamente 50 pg/ml, superior a o aproximadamente 60 pg/ml, superior a o aproximadamente 70 pg/ml, superior a o aproximadamente 80 pg/ml o superior a o aproximadamente 90 pg/ml.

También describimos una población de linfocitos T que expresan más de o igual a 1 receptor de superficie de linfocitos T que reconoce más de o igual a 1 antígeno específico en una célula diana que expresa mutaciones no sinónimas; (a) enriquecer una población de linfocitos obtenidos de un sujeto donante para producir una primera población de linfocitos T; (b) estimular la primera población con uno o más agentes estimulantes de linfocitos T para producir una segunda población de linfocitos T activados en donde la estimulación se realiza en un sistema cerrado usando medio sin suero; (c) cocultivar la segunda población de linfocitos T en presencia de células presentadoras de antígeno que presentan uno o más péptidos no nativos en un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en un sistema cerrado usando medio sin suero, dichos uno o más péptidos no nativos son péptidos correspondientes a mutaciones somáticas no sinónimas asociadas en el tumor de un sujeto, para producir una tercera población de células que contiene linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T endógenos reactivos a la mutación que codifica péptidos del tumor (linfocitos T reactivos a tumores); (d) separar las células presentadoras de antígeno de los linfocitos T en la tercera población de células en un sistema cerrado; (e) después de la separación, Seleccionar linfocitos T que contienen TCR endógenos que son reactivos a péptidos presentes en la APC basándose en marcadores de regulación positiva en linfocitos T en un sistema cerrado para producir una cuarta población que contiene las células seleccionadas; y (f) expandir la cuarta población de células seleccionadas en presencia de uno o más agentes estimulantes de linfocitos T en un sistema cerrado usando medio sin suero.

El marcador de superficie celular es un TCR. En algunas de cualquiera de las divulgaciones proporcionadas, la célula diana es una célula cancerosa. En algunas de cualquiera de las divulgaciones proporcionadas, la célula cancerosa es una neoplasia maligna epitelial. En algunas de cualquiera de las divulgaciones proporcionadas, el antígeno es un neoantígeno.

En algunas de cualquiera de las divulgaciones proporcionadas, el tiempo desde el enriquecimiento de la población de linfocitos hasta la producción de linfocitos T expandidos es inferior a 30 días. En algunas de cualquiera de las divulgaciones proporcionadas, los linfocitos T se utilizan para tratar a un paciente con cáncer.

También describimos una composición farmacéutica que comprende la composición terapéutica de linfocitos T producida mediante cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la composición farmacéutica comprende una dosis terapéutica de los linfocitos T.

También describimos una composición que comprende linfocitos T reactivos a tumores, en donde al menos el o aproximadamente el 40 %, al menos el o aproximadamente el 50 %, al menos el o aproximadamente el 60 %, al menos el o aproximadamente el 70 %, al menos el o aproximadamente el 80 %, o al menos el o aproximadamente el 90 % del total de células o linfocitos T totales en la composición son linfocitos T reactivos a tumores o son positivos para uno o más marcadores de superficie de regulación positiva de linfocitos T expresados en linfocitos T reactivos o activados. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T se selecciona del grupo que consiste en CD107, CD107a, CD39, CD103, CD137 (4-1BB), CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134, CD258, CD256, PD-1, TIM-3 y LAG-3. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T es CD137 y/o CD 134. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T se selecciona del grupo que consiste en CD107, CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134, CD258 y CD256. En algunas de

cualquiera de las divulgaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T se selecciona del grupo que consiste en CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90 y CD38. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T comprende al menos dos marcadores seleccionados de CD107a y CD39, CD107a y CD103, CD107a y CD59, CD107a y CD90, CD107a y CD38, CD39 y CD103, CD39 y CD59, CD39 y CD90, CD39 y CD38, CD103 y CD59, CD103 y CD90, CD103 y CD38, CD59 y CD90, CD59 y CD38 y CD90 y CD38. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T comprende además CD137. En algunas de cualquiera de las realizaciones, el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T reactivos comprende al menos dos marcadores seleccionados de CD107a y CD137, CD38 y CD137, CD103 y CD137, CD59 y CD137, CD90 y CD137 y CD38 y CD137. En algunas de cualquiera de las divulgaciones proporcionadas, la regulación positiva de uno o más marcadores de linfocitos T comprende además al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en PD-1, TIM-3 y LAG-3.

En algunas de cualquiera de las divulgaciones, los linfocitos T son linfocitos T CD3+ o comprenden linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, los linfocitos T comprenden linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, en donde la proporción entre linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ está entre o aproximadamente 1:100 y o aproximadamente 100:1, entre o aproximadamente 1:50 y o aproximadamente 50:1, entre o aproximadamente 1:25 y o aproximadamente 25:1, entre o aproximadamente 1:10 y o aproximadamente 10:1, entre o aproximadamente 1:5 y o aproximadamente 5:1, o entre o aproximadamente 1:2,5 y o aproximadamente 2,5:1. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, el número de linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T totales positivos para el marcador de superficie de activación de linfocitos T, o de células viables de los mismos, en la composición está entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 50×10^9 , entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 30×10^9 , entre $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente de 12×10^9 , entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 60×10^8 , entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 15×10^8 , entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 8×10^8 , entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente $3,5 \times 10^8$, entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 1×10^8 , entre 1×10^8 y o aproximadamente de 50×10^9 , entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente 30×10^9 , entre 1×10^8 y o aproximadamente de 12×10^9 , entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente 60×10^8 , entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente 15×10^8 , entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente 8×10^8 , entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente $3,5 \times 10^8$, entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 50×10^9 , entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 30×10^9 , entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 12×10^9 , entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 60×10^8 , entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 15×10^8 , entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 8×10^8 , entre o aproximadamente 8×10^8 y o aproximadamente 50×10^9 , entre o aproximadamente 8×10^8 y o aproximadamente 30×10^9 , entre o aproximadamente 8×10^8 y o aproximadamente 12×10^9 , entre o aproximadamente 8×10^8 y o aproximadamente 60×10^8 , entre o aproximadamente 60×10^8 y o aproximadamente 50×10^9 , entre o aproximadamente 60×10^8 y o aproximadamente 30×10^9 , entre o aproximadamente 60×10^8 y o aproximadamente 12×10^9 , entre o aproximadamente 12×10^9 y o aproximadamente 50×10^9 , entre o aproximadamente 12×10^9 y o aproximadamente 30×10^9 , o entre aproximadamente 30×10^9 y o aproximadamente 60×10^9 , cada uno inclusive. En algunas de cualquiera de las divulgaciones proporcionadas, la composición comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la composición comprende un crioprotector. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la composición es estéril.

También describimos un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo el método administrar una dosis terapéutica de cualquiera de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la dosis terapéuticamente eficaz está entre 1×10^9 y 10×10^9 linfocitos T. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de más de 1 millón a menos de 100 millones de linfocitos T por kilogramo de peso corporal. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de o aproximadamente 10 millones a o aproximadamente 50 millones de linfocitos T por kilogramo de peso corporal. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de más de 1 millón a menos de 10 millones de linfocitos T por kilogramo de peso corporal. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 5 millones de linfocitos T por kilogramo de peso corporal. En algunas de cualquiera de las divulgaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 10 millones de linfocitos T por kilogramo de peso corporal.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1A y 1B** representan diagramas de flujo de proceso que reflejan los métodos descritos en el presente documento. La **Figura 1A** representa la administración gradual de los experimentos de cocultivo descritos en el Ejemplo 6, mientras que la **Figura 1B** representa un diagrama de flujo de proceso completo para la generación de una población de linfocitos T infiltrantes derivados del tumor específicos del paciente. La **Figura 2A** representa una cinética de ejemplo y una reactividad de neoantígeno de linfocitos T en un proceso típico de expansión de TIL que implica una expansión masiva de linfocitos T con una primera expansión inicial y una segunda expansión rápida en donde la reactividad permanece baja durante todo el proceso, incluso dentro del

producto final. La **Figura 2B** representa además la cinética de ejemplo de un proceso de expansión de TIL que implica una primera expansión inicial, seguido de un enriquecimiento de linfocitos T reactivos a tumores mediante cocultivo con células presentadoras de antígeno presentadoras de péptido neoantígeno, selección de células reactivas a tumores para marcadores de activación (regulación positiva) de linfocitos T y una segunda expansión de células reactivas enriquecidas.

La **Figura 3A** representa la generación de células viables totales de la Población 1 a partir de tejido tumoral de CRC derivado del paciente usando cultivo de fragmentos, homogeneización con enzima y homogeneización sin enzima. La digestión con y sin enzima produjo más células totales que el cultivo a partir de fragmentos. El porcentaje de viabilidad de estas células se muestra en la **Figura 3B**. Las viabilidades de los cultivos generados a partir de fragmentos y digeridos con enzima fueron mayores que las de los derivados mediante homogeneización sin enzima.

La **Figura 4A** representa la generación de células de la Población 1 a partir de tejido tumoral de melanoma derivado del paciente usando cultivo de fragmentos u homogeneización con o sin enzima. El cultivo de fragmentos produjo más células totales que los cultivos iniciados a partir de suspensiones de células individuales. El porcentaje de viabilidad de estas células se muestra en la **Figura 4B**. La población generada a partir de fragmentos mostró una mayor viabilidad que las células procedentes de suspensiones de células individuales.

La **Figura 5** representa curvas de crecimiento (**Figura 5A**), así como el factor de expansión (**Figura 5B**) de células de la Población 2 derivadas de tumores primarios de CRC en una placa de cultivo convencional de 6 pocillos o en una placa de cultivo de 24 pocillos permeable a los gases. La **Figura 5** también representa el número total de células (**Figura 5C**), así como el factor de expansión (**Figura 5D**) de células de la Población 2 derivadas de tumores primarios de CRC contrastadas por el método de extracción celular, ya sea fragmento o cultivo de suspensión de células individuales.

La **Figura 6** representa curvas de crecimiento (**Figura 6A**), así como el factor de expansión (**Figura 6B**) de células de la Población 2 derivadas de tumores de melanoma primario en una placa de cultivo de 6 pocillos o en una placa de cultivo de 24 pocillos permeable a los gases.

La **Figura 7** representa el número total de células (**Figura 7A**), así como el factor de expansión (**Figura 7B**) de células de la Población 2 derivadas de tumores primarios de CRC utilizando medios OpTmizer o RPMI sin suero suplementados con suero humano al 5 %. De forma similar, La **Figura 8** representa el número total de células (**Figura 8A**), así como el factor de expansión (**Figura 8B**) de células de la Población 2 derivadas de tumores de melanoma primario utilizando medios OpTmizer o RPMI sin suero suplementados con suero humano al 5 %.

La **Figura 9** representa el número total de células (**Figura 9A**), así como el factor de expansión (**Figura 9B**) de células de la Población 2 derivadas de tumores CRC y cultivadas en medios suplementados con una concentración baja (300 UI/ml) o una concentración alta (600 UI/ml) de IL-2 humana recombinante. Estos datos se representan de manera similar para las células derivadas de tumores de melanoma en la **Figura 10A y 10B**. No se observó que fuera necesaria una alta concentración de IL-2 para la expansión celular.

La **Figura 11A** representa el número total de células de la Población 2 y la **Figura 11B** representa la expansión de cultivos celulares derivados de melanoma que no fueron estimulados o estimulados con OKT3, un anticuerpo monoclonal anti-CD3, se observó que eran muy similares.

La (**Figura 12A-C**) representa el porcentaje de regulación positiva de los marcadores de activación en linfocitos T CD8+, CD38 y CD39 (**Figura 12A**), CD134 y CD137 (**Figura 12B**), y CD69 y CD90 (**Figura 12C**), entre 0 y 48 horas después de la activación con OKT3.

La (**Figura 13A-C**) representa el porcentaje de regulación positiva de los marcadores de activación en linfocitos T CD4+, CD38 y CD39 (**Figura 13A**), CD134 y CD137 (**Figura 13B**), y CD69 y CD90 (**Figura 13C**), entre 0 y 48 horas después de la activación con OKT3.

La **Figura 14** representa la expresión de marcadores de ejemplo seleccionados en un cultivo de suspensión de células individuales generado a partir de un tumor de CRC el Día 0.

La (**Figura 15A-E**) representa la pureza de los linfocitos CD3+ como porcentaje de las células de la Población 1.

La **Figura 15A** representa la pureza de las células de SCS del Día 0 de un tumor CRC después de la homogeneización sin enzima, con 1 mg/ml (baja) de enzima y 5 mg/ml (alta) de enzima. Estos datos se muestran de manera similar para un cultivo derivado de melanoma en la **Figura 15B**. La **Figura 15C** representa la pureza de las células de la Población 1 CD3+ del Día 0 (SCS inicial) y del Día 6 a partir de fragmentos cultivados en presencia o ausencia de estimulación con OKT3. La **Figura 15D** muestra la pureza relativa de los linfocitos CD3+ de un donante de CRC el Día 11 usando fragmentos cultivados en medios suplementados con 6000 UI/ml (alta) o 300 UI/ml (baja) de IL-2 recombinante. La **Figura 15E** representa células de la población 1 (Día 9) a partir de fragmentos cultivados en medio OpTmizer sin suero o RPMI con estimulación con OKT3 y/o IL-2 en concentraciones altas o bajas. Estas observaciones respaldan que las SCS de biopsias tumorales de pacientes con CRC pueden ser más capaces de proporcionar una mayor cantidad de linfocitos T para la expansión que las células obtenidas del cultivo de fragmentos de tumor.

La **Figura 16** representa la pureza de células de la Población 1 CD3+ derivadas de un paciente con melanoma como cultivos de fragmentos del Día 9 a concentraciones altas y bajas de IL-2 y con medio RPMI que contiene suero u OpTmizer sin suero.

La **Figura 17A** representa la generación de células de la Población 3 después del cocultivo con células dendríticas cargadas con péptido en concentraciones de 0,1 ng/ml a 20 ng/ml. La **Figura 17B** representa el factor de aumento en el mismo experimento de linfocitos T que se cocultivaron con células dendríticas descargadas (**Figura 17B**).

La **Figura 18A** compara la estimulación con un péptido o dos péptidos descrito como % de expresión de 41BB/OX40. La **Figura 18B** representa la estimulación con un péptido o dos péptidos descrito como factor de

aumento de los linfocitos T que estaban inactivados.

La **Figura 19A** compara dos proporciones entre linfocitos T y células dendríticas, 1:1 y 1:2, descrito como % de expresión de 41BB/OX40. La **Figura 19B** compara dos proporciones entre linfocitos T y células dendríticas, 1:1 y 1:2, descrito como un factor de aumento de los linfocitos T que estaban inactivados.

La **Figura 20A** representa el porcentaje de TCR reactivo a neoantígeno antes y después del cocultivo con péptidos de neoantígeno autólogos y la clasificación de linfocitos T procedentes de la sangre periférica de tres donantes sanos. La **Figura 20B** representa la reactividad promedio de clase I antes y después del cocultivo y la clasificación de células CD8+.

La **Figura 21A y Figura 21B** representa la recuperación de la clasificación de células utilizando el Sony FX500 como entrada y salida total de células para dos rondas independientes (**Figura 21A**) y porcentaje de recuperación (**Figura 21B**). La **Figura 22** representa la pureza y al acotamiento de una población de CD4+ a partir de la clasificación de células utilizando el Sony FX500. Los resultados demuestran una alta recuperación de células después de la selección y clasificación de células positivas para marcadores de regulación positiva.

La **Figura 23A-Figura 23C** representan la expansión de linfocitos T infiltrantes de tumor después de la clasificación. La **Figura 23A** representa el número total de células y la **Figura 23B** representa el factor de expansión, de células de la Población 5 derivadas de células de la Población 4 después del cocultivo con o sin células dendríticas cargadas con péptido de tipo silvestre, péptido asociado a tumor, o ningún péptido. Los números de células proyectados después de la expansión de las células de la Población 4 a las células de la Población 5 en varios números de recuperación de células después de la clasificación se muestran en la **Figura 23C**.

La **Figura 24A** representa la secreción de IFN-gamma medida dentro de un cocultivo en masa, población clasificada positiva (seleccionada) mediante la expresión de CD137 y/o CD134 a partir de células de cocultivo en masa (enriquecidas), o población clasificada negativa (no seleccionada) a partir de células de cocultivo en masa, después de la estimulación con péptido mutante (mut) o normal, péptido de tipo silvestre (WT) de una paciente con cáncer de ovario. La **Figura 24B** representa el enriquecimiento de la población específica de neoantígeno de las células específicas reactivas a tumores en la clasificación positiva y negativa en comparación con los linfocitos T no clasificados en masa. La **Figura 24C** representa el número de clonotipos de TCR presentes en las poblaciones seleccionadas y no seleccionadas y demuestra que la diversidad de TCR entrantes es alta en la población de linfocitos T sin clasificar y que hay un enriquecimiento de clones de TCR únicos en la población seleccionada. La **Figura 24D** representa las poblaciones de células previas y posteriores a la clasificación de la Muestra A que se observó que contenían células CD4+ y CD8+, lo que indica que las células reactivas de clase I y clase II están presentes en la población enriquecida.

La **Figura 25A** representa la secreción de IFN-gamma medida dentro de un cocultivo en masa, población clasificada positiva (seleccionada) mediante expresión de CD137 y/o CD134 a partir de células de cocultivo en masa (enriquecidas), o población clasificada negativa (no seleccionada) a partir de células de cocultivo en masa, tras la estimulación con anti-CD3 (OKT3) de un paciente con cáncer colorrectal. La **Figura 25B** representa el enriquecimiento de la población específica de neoantígeno de las células específicas reactivas a tumores en la clasificación positiva y negativa en comparación con los linfocitos T no clasificados en masa. La **Figura 25C** representa el perfil de clonalidad de TCR presente en las poblaciones seleccionadas y no seleccionadas. La **Figura 25D** representa las poblaciones de células previas y posteriores a la clasificación que se observó que contenían células CD4+ y CD8+, lo que indica que las células reactivas de clase I y clase II están presentes en la población enriquecida.

La **Figura 26A** representa el enriquecimiento de una población específica de neoantígeno de células específicas reactivas a tumores en un cocultivo en masa, población clasificada positiva (seleccionada) mediante expresión de CD137 y/o CD134 a partir de células de cocultivo en masa (enriquecidas), o población clasificada negativa (no seleccionada) a partir de células de cocultivo en masa. La **Figura 26B** Representa el perfil de clonalidad de TCR presente en las poblaciones seleccionadas y no seleccionadas. La **Figura 26C** representa poblaciones de células previas (en masa) y posteriores a la clasificación, que se observó que contenían células reactivas CD4+ clase I y CD8+ clase II.

Descripción detallada

La invención proporciona un método para fabricar linfocitos T para usar en una composición celular terapéutica, en donde los linfocitos T expresan un receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un antígeno en la superficie de una célula diana, comprendiendo el método: (1) procesar una muestra biológica que contiene una población de células linfocitos T obtenidas de un sujeto donante que tiene un tumor para producir una primera población de células linfocitos T; (2) estimular la primera población con uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para la expansión de linfocitos T en la población para producir una segunda población de linfocitos T activados en donde la estimulación se realiza en un sistema cerrado usando medio sin suero, en donde el uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante; (3) cocultivar la segunda población de linfocitos T en presencia de células presentadoras de antígeno que presentan uno o más péptidos no nativos en un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en un sistema cerrado usando medio sin suero, dichos uno o más péptidos no nativos son péptidos correspondientes a mutaciones somáticas no sinónimas asociadas en el tumor del sujeto, para producir una tercera población de células que contiene linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T endógenos reactivos a la mutación que codifica los péptidos del tumor; (4) seleccionar, de la tercera población de células, la población de linfocitos T que contiene TCR endógenos que son reactivos con los péptidos presentes en las APC basándose en uno o más marcadores de regulación positiva expresados en linfocitos T reactivos o activados en un

sistema cerrado para producir una cuarta población que contiene los linfocitos T seleccionados; (5) expandir la cuarta población de células seleccionadas en presencia de uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para expandir los linfocitos T en la población en un sistema cerrado usando medio sin suero para producir una composición de linfocitos T expandidos para usar como una composición celular terapéutica, en donde el uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante.

De acuerdo con las realizaciones del presente documento, se proporcionan métodos o procesos para fabricar preparaciones de linfocitos T que pueden ser útiles para tratar pacientes con una enfermedad o afección patológica. A diferencia de los métodos de producción conocidos, los métodos y procesos descritos en el presente documento pueden completarse en un tiempo significativamente más corto y recuperar un mayor número de linfocitos T endógenos que expresan TCR, ofreciendo de este modo una ventaja significativa para proporcionar células clínicamente en dosis terapéuticas. También se proporcionan en el presente documento poblaciones de linfocitos T producidas mediante métodos descritos en el presente documento y composiciones farmacéuticas de los mismos.

Los métodos proporcionados se refieren a la producción de una terapia con linfocitos T reactivos a antígenos asociados a tumores, como los neoantígenos. Las células cancerosas acumulan muchas mutaciones diferentes en el ADN como parte del proceso tumorigénico. Estas mutaciones pueden provocar cambios de aminoácidos en las regiones codificantes de proteínas. Para que el sistema inmunitario reconozca una mutación, la proteína debe procesarse intracelularmente y presentarse en la superficie con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los neoantígenos peptídicos (también denominados en el presente documento neopeptídeos o neopeptídeos peptídicos) son los péptidos mutantes presentados por el complejo MHC que pueden ser reconocidos por un linfocito T mediante la unión al TCR. Para que el sistema inmunitario reconozca la mutación, debe expresarse en la superficie de la célula cancerosa a través del complejo MHC y el linfocito T debe tener un TCR que reconozca el péptido mutado. Estos neoantígenos pueden ser presentados por MHC de clase I y MHC de clase II, y son reconocidos por los linfocitos T CD8+ y CD4+ respectivamente.

El método descrito se utiliza para fabricar linfocitos T que expresan receptores de la superficie celular, en donde el receptor de la superficie celular es un receptor de linfocitos T (TCR) o un nuevo grupo de TCR. La población de linfocitos T es o incluye linfocitos T reactivos que expresan un receptor de linfocitos T (TCR) capaz de reconocer antígenos peptídicos en la superficie de las células diana. De manera específica, para que un antígeno sea reconocido por el sistema inmunitario, la proteína debe procesarse intracelularmente en fragmentos peptídicos que luego se presentan en la superficie con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Un TCR tiene dos cadenas de proteínas, que están diseñadas para unirse con péptidos específicos presentados por una proteína del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de ciertas células. Dado que los TCR reconocen péptidos en el contexto de moléculas MHC expresadas en la superficie de una célula diana, los TCR tienen el potencial de reconocer antígenos no solo presentados directamente en la superficie de las células diana, p. ej., células cancerosas, sino también presentados por células presentadoras de antígeno, como las que están presentes en el tumor, microambientes inflamatorios e infectados, y en órganos linfoides secundarios. Los linfocitos T reactivos que expresan dichos receptores de la superficie celular pueden usarse para atacar y destruir cualquier célula diana, incluyendo, pero sin limitación, células infectadas, células dañadas o células disfuncionales. Por tanto, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, los linfocitos T fabricados que expresan el receptor de la superficie celular pueden usarse para atacar y destruir cualquier célula diana, incluyendo, pero sin limitación, células infectadas, células dañadas o células disfuncionales. Ejemplos de dichas células diana pueden incluir células cancerosas, células infectadas por virus, células infectadas por bacterias, células inflamatorias activadas disfuncionalmente (por ejemplo, células endoteliales inflamatorias) y células involucradas en reacciones inmunitarias disfuncionales (por ejemplo, células involucradas en enfermedades autoinmunitarias).

En algunas realizaciones, un "receptor de linfocitos T" o "TCR" es una molécula que contiene cadenas α y β variables (también conocidas como TCR α y TCR β , respectivamente) o cadenas γ y δ variables (también conocidas como TCR γ y TCR δ , respectivamente), o porciones de unión a antígeno del mismo, y que es capaz de unirse específicamente a un péptido unido a una molécula de MHC. En algunas realizaciones, el TCR está en forma $\alpha\beta$. Habitualmente, los TCR que existen en formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ son generalmente estructuralmente similares, pero los linfocitos T que los expresan pueden tener distintas ubicaciones o funciones anatómicas. Un TCR puede encontrarse en la superficie de las células T (o linfocitos T) donde generalmente es responsable de reconocer los antígenos unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

En algunos aspectos, los linfocitos T reactivos son linfocitos T reactivos a tumores que reconocen un neoantígeno del cáncer. La mayoría de los neoantígenos surgen de mutaciones pasajeras, lo que significa que no infieren ninguna ventaja de crecimiento para la célula cancerosa. Un número menor de mutaciones promueve activamente el crecimiento del tumor, éstas se conocen como mutaciones conductoras. Es probable que las mutaciones pasajeras den lugar a neoantígenos que son únicos para cada paciente y pueden estar presentes en un subconjunto de todas las células cancerosas. Las mutaciones conductoras dan lugar a neoantígenos que probablemente estén presentes en todas las células tumorales de un individuo y potencialmente compartidos. En algunas realizaciones del método proporcionado, la población de linfocitos T contiene linfocitos T reactivos a tumores que pueden reconocer neoantígenos que contienen mutaciones pasajeras y/o conductoras.

Los métodos proporcionados se pueden utilizar para la producción *ex vivo* de una terapia con linfocitos T, incluyendo para la expansión *ex vivo* de linfocitos T autólogos reactivos a tumores. En algunos aspectos, los neoantígenos son dianas ideales para las inmunoterapias porque representan dianas específicas de la enfermedad. Por ejemplo, estos antígenos generalmente no están presentes en el cuerpo antes de que se desarrollara el cáncer y son verdaderamente
5 específicos del cáncer, no se expresan en células normales y no están sujetos a toxicidad inmunitaria fuera de la diana. Por tanto, el repertorio único de neoantígenos específicos del paciente puede provocar una fuerte respuesta inmunitaria específica de las células cancerosas, evitando las células normales. Esta es una ventaja sobre otras dianas de la terapia celular que pueden no ser dianas específicas de una enfermedad, ya que incluso niveles bajos de antígeno diana en células normales pueden provocar una toxicidad autoinmunitaria fatal grave en el contexto de
10 terapias diseñadas dirigidas a antígenos comunes. Por ejemplo, un programa anti MAGE-A3-TCR en pacientes con melanoma se detuvo debido a muertes relacionadas con el estudio atribuidas a la reactividad cruzada con una diana similar MAGE-A12, que se expresa en un nivel bajo en el cerebro. Un desafío importante en la inmunoterapia contra el cáncer ha sido la identificación de dianas cancerosas.

15 Estudios clínicos recientes han demostrado que los linfocitos T aislados de tumores resecados quirúrgicamente poseen TCR que reconocen neoantígenos, y expandir estas poblaciones de TIL reactivos a neoantígenos y reinfundirlos en el paciente puede, en algunos casos, resultar en un beneficio clínico espectacular. Esta terapia personalizada ha generado respuestas clínicas notables en ciertos pacientes con tumores epiteliales comunes.

20 Los métodos existentes para obtener y generar linfocitos T reactivos a tumores no son del todo satisfactorios. Por ejemplo, el aislamiento directo de linfocitos T reactivos a tumores de un sujeto sin expansión no es factible porque no se pueden obtener cantidades terapéuticamente eficaces de dichas células. Como una alternativa, se han realizado intentos para identificar TCR específicos de un neoantígeno deseado para la ingeniería recombinante del TCR en linfocitos T para usar en métodos de terapia celular adoptiva. Dichos enfoques, sin embargo, producen solo un TCR
25 único contra un neoantígeno específico y, por lo tanto, carecen de diversidad para reconocer un repertorio más amplio de múltiples mutaciones específicas de tumores. Otros métodos implican la expansión masiva de linfocitos T de una fuente tumoral, lo que tiene el riesgo de expandir linfocitos T que no reaccionan a un antígeno tumoral y/o que pueden incluir una serie de células inespecíficas que podrían presentar actividad inhibidora. Por ejemplo, los linfocitos T reguladores (Tregs) de tumores son una subpoblación de linfocitos T CD4+, que se especializan en suprimir las
30 respuestas inmunitarias y podrían limitar la reactividad de un producto de linfocitos T. Estos enfoques adicionales que han buscado expandir los linfocitos T reactivos a tumores *ex vivo* no son selectivos de modo que los linfocitos T no reactivos en el cultivo pueden expandirse preferentemente sobre los linfocitos T reactivos dando como resultado un producto final que carece de reactividad satisfactoria y/o en el que el número de linfocitos T reactivos a tumores sigue siendo insuficiente. Se necesitan métodos para producir linfocitos T reactivos a tumores para terapia.

35 Las realizaciones proporcionadas se refieren a métodos mejorados para identificar y expandir linfocitos T *ex vivo*, incluyendo linfocitos T reactivos a tumores, para usar en terapias con linfocitos T. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados mejoran o aumentan el crecimiento y la supervivencia de los linfocitos T, tales como los linfocitos T reactivos a tumores, fuera del cuerpo. En realizaciones particulares, los métodos enriquecen la expansión de los linfocitos T reactivos en comparación con los linfocitos T no reactivos y promueven su supervivencia y crecimiento en cultivo. *ex vivo*. En algunas realizaciones, los métodos resultantes se pueden llevar a cabo en un sistema cerrado. Los métodos en algunas realizaciones se llevan a cabo de forma automatizada o parcialmente automatizada.

45 Los métodos proporcionados dan como resultado una población enriquecida de linfocitos T reactivos a mutaciones específicas del paciente, tales como las basadas en la selección de marcadores de regulación positiva después de la presentación de antígenos mutantes y/o basadas en la expansión de linfocitos T enriquecidos en linfocitos T reactivos a tumores después del cocultivo con células presentadoras de antígeno que presentan neoepítopos peptídicos. Por ejemplo, los métodos de cultivo de las células incluyen métodos para proliferar y expandir las células, que implican particularmente etapas para enriquecer para la proliferación y expansión de linfocitos T reactivos a tumores tales como mediante selección de dichas células, o basándose en la regulación positiva de una molécula de la superficie celular en linfocitos T activados (marcador de activación de linfocitos T) que están asociadas con o son indicativas de linfocitos T reactivos a tumores. Los métodos proporcionados dan como resultado un producto que contiene linfocitos T reactivos a tumores que pueden dirigirse a muchas mutaciones y/o que contiene cientos de TCR que son reactivos a diferentes
50 antígenos tumorales. Por tanto, dichos linfocitos T reactivos a tumores ofrecen ventajas en comparación con los métodos existentes en los que las células se transducen para expresar un único TCR reactivo a un neoepítipo.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados, se usa una fuente de péptidos tumorales potenciales para identificar TCR que son reactivos a los neoantígenos en un proceso que incluye la expansión de los linfocitos T reactivos a los péptidos neoantigénicos del tumor. Los métodos proporcionados incluyen métodos de cocultivo *ex vivo* en los que una población de linfocitos T que se han expandido a partir de linfocitos T presentes en o a partir de una muestra biológica (por ejemplo, fragmentos de tumores o sangre periférica u otra fuente de linfocitos T) se incuban en presencia de células presentadoras de antígeno que han estado en contacto con, o se han obligado a presentar, los péptidos neoantigénicos. En aspectos particulares, los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno son autólogos del sujeto portador del tumor a partir del cual se identificaron los péptidos. Los métodos proporcionados incluyen además etapas para separar, enriquecer y/o seleccionar linfocitos T reactivos a tumores del cocultivo antes
65

o junto con su posterior expansión *ex vivo*.

La Figura 1A representa un esquema de un proceso de ejemplo para fabricar una composición terapéutica de linfocitos T de acuerdo con los métodos proporcionados. En el proceso de ejemplo, se obtiene una muestra de tumor de un paciente para la identificación y generación de péptidos para usar en métodos de cocultivo con células presentadoras de antígeno (APC) que presentan los péptidos y linfocitos T de antígeno autólogos obtenidos del mismo sujeto. En algunos casos, una población de linfocitos T del paciente, que contiene, por ejemplo, linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) o linfocitos de sangre periférica (PBL), se estimula en condiciones para expandir las células, antes del cocultivo con células presentadoras de antígeno que se han puesto en contacto o expuestas a neoepítopos peptídicos para su presentación en un complejo principal de histocompatibilidad. Después del cocultivo en condiciones en las que las células presentadoras de antígeno presentan péptidos en el contexto de un complejo principal de histocompatibilidad, los linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T positivos para uno o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T (también llamado marcador de regulación positiva o marcador de linfocitos T reactivos, por ejemplo, CD70a) asociados con linfocitos T reactivos a tumores se pueden seleccionar y cultivar en condiciones de expansión de acuerdo con los métodos proporcionados, como la incubación con un agente(s) estimulador de linfocitos T (por ejemplo, IL-2 recombinante, anti-CD3 y/o anti-CD28). El cultivo se puede llevar a cabo en presencia de una o más citocinas recombinantes (por ejemplo, IL-2) para favorecer la proliferación y expansión de las células. El proceso se puede llevar a cabo en presencia de medios sin suero que contengan nutrientes. Una o más o todas las etapas se pueden llevar a cabo en un sistema cerrado, como por ejemplo sin exposición de las células al medio ambiente. Al alcanzar una dosis terapéutica o un número umbral de células, las células se pueden recoger y formular, en algunos casos concentrar o criopreservar, y usar para administración a un sujeto tal como por infusión. La Figura 1B representa un proceso de ejemplo en el que se puede llevar a cabo una etapa de criopreservación después de una o más de las etapas.

Los métodos proporcionados ofrecen ventajas en comparación con los métodos existentes para producir y expandir TIL porque los métodos proporcionados implican etapas para enriquecer células reactivas a tumores, tal como mediante la etapa de cocultivo con APC presentadoras de péptidos seguido de la selección de clones de linfocitos T reactivos que han regulado positivamente uno o más marcadores de activación de linfocitos T. En virtud de este proceso, la pequeña población inicial de linfocitos T reactivos a tumores expandidos a partir de la muestra biológica (por ejemplo, tumor) está enriquecida en células que son o probablemente sean células reactivas a tumores antes de una segunda etapa de expansión posterior, promoviendo de este modo la conservación y expansión de las células de interés y limitando la expansión de los linfocitos T inespecíficos que no son reactivos a un antígeno tumoral y/o que pueden incluir células que presentan actividad inhibitoria (**Figura 2A**). Esto contrasta con los métodos existentes que implican la expansión pasiva de linfocitos T en masa en los que todos los linfocitos T de un tumor se someten a una primera expansión inicial, por ejemplo, con altas concentraciones de IL-2, seguido de una segunda expansión rápida de los linfocitos T presentes después de la expansión inicial. En otros métodos similares, si bien el total de células viables (TVC) puede ampliarse enormemente mediante estos procesos alternativos, no existe ninguna etapa para garantizar activamente que los linfocitos T reactivos a tumores se propaguen predominantemente (**Figura 2B**). Además, los métodos proporcionados se llevan a cabo para maximizar la cantidad de células reactivas a tumores que se pueden recoger, por ejemplo, cocultivando todas las células propagadas después de la primera expansión con APC presentadoras de péptidos y, a continuación, seleccionando entre todas las células en masa después del cocultivo las células positivas para el uno o más marcadores de activación antes de la posterior segunda expansión. En aspectos de los métodos proporcionados, todas las etapas del método se llevan a cabo en un sistema cerrado.

Los métodos proporcionados incluyen una o más características que proporcionan o se relacionan con un proceso mejorado, más eficiente y/o más sólido para producir *ex-vivo* una composición terapéutica de linfocitos T reactivos a tumores. En particular, la divulgación se refiere a métodos que proporcionan ventajas sobre los métodos disponibles para producir una composición celular terapéutica de TIL. Dichas ventajas incluyen, por ejemplo, coste reducido, racionalización, enriquecimiento mejorado de linfocitos T reactivos a tumores en la composición terapéutica y mayor eficacia de la composición terapéutica, incluso entre diferentes sujetos y condiciones tumorales.

Entre los hallazgos del presente documento se encuentra la observación de que se pueden emplear concentraciones más bajas de IL-2 recombinante durante una o ambas etapas de expansión con éxito. Muchos métodos existentes utilizan altas concentraciones de IL-2 de 6000 UI/ml para la expansión de TIL por linfocitos T. Sin embargo, las altas concentraciones de IL-2 pueden aumentar el costo del proceso y pueden ser limitantes. En algunos casos, las altas concentraciones de IL-2 pueden provocar impactos negativos en la diferenciación de los linfocitos T al impulsar la diferenciación de los linfocitos T efectores sobre los linfocitos T de memoria temprana que pueden ser más deseables en una composición terapéutica de linfocitos T. Los métodos proporcionados se pueden llevar a cabo con concentraciones varias veces inferiores a 6000 UI/ml, tales como concentraciones inferiores a 1000 UI/ml o aproximadamente, por ejemplo, de o aproximadamente 300 UI/ml a o aproximadamente 1000 UI/ml. En realizaciones particulares, la concentración de IL-2 es de o aproximadamente 300 UI/ml.

La población de linfocitos T se obtiene de una muestra biológica que se sabe que contiene linfocitos T. En algunas realizaciones, la población de linfocitos T está enriquecida a partir de una muestra biológica de un sujeto, en particular un sujeto humano. La muestra biológica puede ser cualquier muestra que contenga una población masiva de linfocitos T. En algunas realizaciones, la muestra biológica es o incluye células mononucleares de sangre periférica. En algunas

realizaciones, la muestra biológica es una muestra de sangre periférica o de suero. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de ganglios linfáticos. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra tumoral. En algunos aspectos, los linfocitos T en masa pueden incluir linfocitos T infiltrantes de tumores (TIL). En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto que tiene cáncer, infección vírica, infección bacteriana, o es un sujeto con una afección inflamatoria. El sujeto tiene un cáncer.

En aspectos de los métodos proporcionados, la fuente inicial de células en el método pueden ser fragmentos de tumor (por ejemplo, fragmentos de 1 a 8 mm de diámetro) o puede ser una preparación de una suspensión de células individuales a partir de digestión enzimática de fragmentos de tumor. Se observa en el presente documento que, si bien ciertas fuentes pueden ser superiores para algunos tipos de tumores, tanto los fragmentos como las suspensiones de células individuales pueden favorecer la expansión de los linfocitos T y el enriquecimiento de los linfocitos T reactivos a tumores. En algunos casos, la fuente de células tumorales se puede elegir según el tipo de tumor o cáncer, tales como optimizar o aumentar la expansión y el enriquecimiento de los linfocitos T reactivos a tumores del tumor. En un ejemplo, el cáncer es un melanoma y la población inicial de linfocitos son fragmentos de tumor, como por ejemplo de un tumor resecado. En otro ejemplo, el cáncer es un cáncer colorrectal y la población inicial de linfocitos es una suspensión de células individuales obtenida por digestión enzimática, por ejemplo, colagenasa, de fragmentos de tumor.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen una etapa de cocultivo de linfocitos T inicialmente expandidos con células presentadoras de antígeno autólogas que han sido cargadas con péptido. Los hallazgos en este documento demuestran que concentraciones relativamente bajas de péptido o un grupo de péptidos (que contiene una pluralidad de péptidos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 más, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores), de modo que cada péptido individual sea inferior a 20 ng/ml, e incluso de tan solo 0,1 ng/ml, puede conducir a un aumento en la activación de los linfocitos T durante el cultivo. En algunas realizaciones, esto puede conducir a un enriquecimiento mejorado de linfocitos T reactivos a tumores en el cocultivo antes de la selección de células positivas para uno o más marcadores de activación de linfocitos T (es decir, marcador de regulación positiva o marcador de linfocitos T reactivos). En algunas realizaciones, la etapa de cocultivo en los métodos proporcionados incluye una proporción entre células derivadas de tumores que contienen linfocitos T y APC autólogas (por ejemplo, células dendríticas) de o aproximadamente 1:5 a o aproximadamente 5:1, como 1:3 a o aproximadamente 3:1, por ejemplo, de o aproximadamente 1:1, e implica cargar las APC con un péptido individual o un grupo de péptidos. En algunas realizaciones, las APC se cargan con una concentración de péptido o grupo de péptidos en la que el péptido individual, o los péptidos individuales del grupo de péptidos en promedio, es menor de o aproximadamente 20 ng/ml, tal como desde o aproximadamente 0,1 ng/ml hasta o aproximadamente 1 ng/ml, por ejemplo, de o aproximadamente 0,1 ng/ml.

Los métodos proporcionados incluyen el enriquecimiento de linfocitos T, tales como linfocitos T CD3+ o un subconjunto de CD4 y/o CD8 de los mismos, basado además en uno o más marcadores cuya expresión está regulada positivamente (por ejemplo, en comparación con linfocitos T en reposo o no activados) o específicos de linfocitos T reactivos o activados (en lo sucesivo en el presente documento "marcador de linfocitos T reactivos" o marcador de activación de linfocitos T). Los linfocitos T reactivos expresarán ciertos marcadores reactivos cuando su TCR endógeno reconozca un antígeno en una célula o tejido diana, tal como cuando un TCR reconoce un neoantígeno en el tumor. Los marcadores de linfocitos T reactivos de ejemplo incluyen uno o más, tal como dos, tres, cuatro o más de, CD107, CD107a, CD39, CD103, CD137 (4-1BB), CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134 (OX40), CD258, CD256, PD-1, TIM-3 o LAG-3. El enriquecimiento o selección de células positivas para uno o más de dichos marcadores de regulación positiva en linfocitos T reactivos o activados se puede llevar a cabo antes o durante una o más etapas del método de expansión. En realizaciones particulares, los métodos proporcionados incluyen el enriquecimiento o la selección de células positivas para uno o más marcadores de regulación positiva en linfocitos T reactivos o activados después de la activación de una población de linfocitos T mediante la incubación del cocultivo con APC presentadoras de péptidos (por ejemplo, DC). En algunas realizaciones, la etapa de seleccionar células positivas para uno o más marcadores de regulación positiva en linfocitos T reactivos o activados del cocultivo puede dar como resultado un enriquecimiento de 2 veces o más de linfocitos T reactivos a tumores específicos de antígeno y/o una disminución sustancial en la clonalidad de TCR, lo que pone de manifiesto un enriquecimiento de clonotipos de TCR concordante con un enriquecimiento de linfocitos T reactivos a tumores. Asimismo, dichos linfocitos T enriquecidos pueden presentar una capacidad mejorada para producir IFN-gamma después de una estimulación específica de antígeno en comparación con los linfocitos T no seleccionadas o los linfocitos T en masa del cocultivo.

En algunas realizaciones, los métodos producen o expanden linfocitos T para usar en terapia celular adoptiva para tratar una enfermedad o afección en la que se sabe o se sospecha que las células o el tejido asociado con la enfermedad o afección expresan un antígeno diana reconocido por los linfocitos T. En algunas realizaciones, la terapia con linfocitos T es autóloga para el sujeto. En algunas realizaciones, la terapia con linfocitos T es alogénica para el sujeto.

A menos que se definan de otra manera, se pretende que todos los términos de la técnica, las notaciones y otros términos o terminología técnicos y científicos utilizados en el presente documento tengan el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la materia objeto reivindicada. En algunos casos, los términos con significados comúnmente comprendidos se definen en el presente documento con fines de

claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no se ha de considerar necesariamente como representativa de una diferencia sustancial frente a lo que se comprende en la materia.

- 5 Si una definición expuesta en el presente documento es contraria a o de otro modo inconsistente con una definición expuesta en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones a las que se hace referencia, la definición expuesta en el presente documento prevalece sobre la definición que se encuentra en la referencia.

10 Los encabezados de sección usados en el presente documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como una limitación de la materia objeto descrita.

I. EXPANSIÓN *EX VIVO* DE LINFOCITOS T REACTIVOS A TUMORES

15 Los métodos proporcionados implican la expansión *ex vivo* y producción de una composición terapéutica de linfocitos T, particularmente para usar en relación con el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, el método de fabricación implica el crecimiento y manipulación de células del paciente fuera del cuerpo. Los métodos se refieren a métodos para expandir linfocitos T que contienen un TCR endógeno específico para un antígeno asociado a tumores (en lo sucesivo en el presente documento "linfocitos T reactivos a tumores"). Para los fines de la presente divulgación, la referencia a linfocitos T reactivos a tumores incluye linfocitos T que presentan reactividad a un antígeno tumoral o que probablemente son o se sospecha que son linfocitos T reactivos a tumores debido a la regulación positiva o la expresión de superficie positiva de una proteína expresada en el linfocito T que solo se expresa cuando el TCR endógeno de los linfocitos T reconoce un péptido expresado por las APC, por ejemplo, marcador de activación de linfocitos T. En algunos aspectos, la frecuencia de estas células puede ser baja y para expandir estas células a una dosis terapéutica *ex vivo* se necesitan métodos de enriquecimiento y expansión.

25 Una población que contiene linfocitos T (en lo sucesivo en el presente documento también denominada primera población de linfocitos T) es una población de linfocitos T que se obtiene, selecciona o aísla de una muestra biológica de un sujeto, tal como un sujeto humano, en el que la muestra biológica contiene linfocitos T. En algunas realizaciones, la población que contiene linfocitos T puede provenir de cualquier muestra de fuente biológica que se sepa o se sospeche que contiene linfocitos T que son o que pueden incluir o potencialmente podrían incluir linfocitos T reactivos a tumores. La muestra puede incluir una muestra de tumor que contiene linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), una muestra de sangre (por ejemplo, muestra de aféresis o leucoféresis) que contiene células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o una muestra de ganglios linfáticos. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tumor o un fragmento de tumor que contiene linfocitos infiltrante de tumor o TIL. La población que contiene linfocitos T se puede obtener directamente de un sujeto (por ejemplo, un sujeto sano o con cáncer), tal como mediante selección de linfocitos T o un subconjunto de los mismos de la muestra biológica del sujeto. La muestra biológica proviene de un sujeto que tiene un tumor y en realizaciones particulares contiene linfocitos T reactivos a tumores o que tiene el potencial de contener o que puede contener linfocitos T reactivos a tumores que pueden enriquecerse mediante los métodos proporcionados.

40 La invención proporciona un método para fabricar linfocitos T para usar en una composición celular terapéutica, en donde los linfocitos T expresan un receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un antígeno en la superficie de una célula diana, comprendiendo el método: (1) procesar una muestra biológica que contiene una población de células linfocitos T obtenidas de un sujeto donante para producir una primera población de células linfocitos T; (2) estimular la primera población con uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para la expansión de linfocitos T en la población para producir una segunda población de linfocitos T activados en donde la estimulación se realiza en un sistema cerrado usando medio sin suero, en donde el uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante; (3) cocultivar la segunda población de linfocitos T en presencia de células presentadoras de antígeno que presentan uno o más péptidos no nativos (por ejemplo, neoepítopos peptídicos) en un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (péptido no nativo asociado a MHC), en un sistema cerrado utilizando medio sin suero, dichos uno o más péptidos no nativos son péptidos correspondientes a mutaciones somáticas no sinónimas asociadas en el tumor del sujeto, para producir una tercera población de células que contiene linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T endógenos reactivos a la mutación que codifica los péptidos del tumor; (4) seleccionar, de la tercera población, la población de linfocitos T que contiene TCR endógenos que son reactivos con los péptidos presentes en las APC basándose en uno o más marcadores de regulación positiva expresados en linfocitos T reactivos o activados en un sistema cerrado para producir una cuarta población que contiene los linfocitos T seleccionados; y (5) expandir la cuarta población de células seleccionadas en presencia de uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para expandir linfocitos T en la población en un sistema cerrado usando medio sin suero para producir una composición de linfocitos T expandidos para usar como una composición celular terapéutica, en donde el uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante. En algunas realizaciones, la selección de los linfocitos T en (4) puede implicar agotar o eliminar las APC y/o puede incluir la selección de linfocitos T basada en marcadores de regulación positiva en linfocitos T reactivos o activados. Una o más de las etapas se llevan a cabo en un sistema cerrado utilizando un medio sin suero.

65 En algunas realizaciones, los agentes estimulantes de linfocitos T incluyen además reactivos anti-CD3 (por ejemplo, anticuerpo anti-CD3, tal como OKT3), anti-CD28 (por ejemplo, anticuerpo anti-CD28), tales como un anticuerpo anti-

CD3 (por ejemplo, OKT3) y un anticuerpo anti-CD28 y/o una o más citocinas recombinantes (por ejemplo, IL-7, IL-21 y/o IL-15). En realizaciones particulares, la incubación o cultivo de linfocitos T también se lleva a cabo con medios que contienen nutrientes de modo que las células puedan sobrevivir fuera del cuerpo.

- 5 Los métodos incluyen la incubación con IL-2 recombinante, opcionalmente sola o en combinación con una o más citocinas recombinantes (por ejemplo, IL-7, IL-21 y/o IL-15) y, en algunos casos, uno o más agentes estimulantes de linfocitos T para proporcionar una señal primaria y secundaria (coestimuladora) a las células. Los métodos estándar para cultivar linfocitos T para proporcionar una señal primaria y secundaria (coestimuladora) a las células, implican la incubación con agentes estimulantes de linfocitos T proporcionados por reactivos anti-CD3 (p. ej., OKT3) y anti-CD28.
- 10 En algunas realizaciones, los agentes estimulantes de linfocitos T incluyen adicionalmente un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT3) y un anticuerpo anti-CD28. Normalmente, tales estimulaciones también incluyen una o más citocinas recombinantes adicionales (por ejemplo, IL-7, IL-21 y/o IL-15) y medios que contienen nutrientes de modo que las células puedan sobrevivir fuera del cuerpo.

- 15 Los métodos proporcionados para la expansión de linfocitos T reactivos a tumores implican una primera expansión que implica cultivar la población seleccionada o aislada que contiene linfocitos T (es decir, la primera población de linfocitos T) con una citocina recombinante de una o más de (por ejemplo, IL-7, IL-21 y/o IL-15, e incluyendo IL-2 recombinante. En algunos casos, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T proporciona además una señal primaria y secundaria (coestimuladora) a las células, tal como las proporcionadas por los reactivos anti-CD3 (por ejemplo, OKT3) y anti-CD28, tal como un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT3) o un anticuerpo anti-CD28. La expansión inicial o primera da como resultado una segunda población de linfocitos T que está enriquecida en linfocitos T como resultado de la expansión o proliferación de linfocitos T presentes en la primera población.

- 25 En los métodos proporcionados, los linfocitos T reactivos a tumores se identifican o enriquecen a partir de los linfocitos T estimulados expandidos en la primera etapa mediante una o más etapas adicionales que incluyen el cocultivo *ex vivo* de los linfocitos T estimulados (segunda población de linfocitos T) con células presentadoras de antígeno (APC) y uno o una pluralidad de péptidos que incluyen neoepítomos de un antígeno tumoral (APC/neoepítomos peptídicos). Los métodos proporcionados incluyen el cocultivo *ex vivo* en el que la segunda población de linfocitos T se incubaba con APC, tales como APC autólogas o células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), que han estado expuestas o
- 30 en contacto con uno o más péptidos, por ejemplo, péptidos sintéticos, en condiciones en las que se ha inducido a las APC a presentar uno o más péptidos de un antígeno asociado a tumor. En algunas realizaciones, la población de linfocitos T son linfocitos T autólogos de un sujeto con un tumor y la fuente de péptidos sintéticos son péptidos antigénicos tumorales de un antígeno tumoral del mismo sujeto. En algunas realizaciones, las células del cocultivo *ex vivo* son una población de células (tercera población) que incluye linfocitos T reactivos a tumores que reconocen o son
- 35 activados por un péptido presentado en un MHC de una APC en el cultivo. En algunas realizaciones, las células del cocultivo *ex vivo* representa una fuente de células que están enriquecidas con linfocitos T reactivos a tumores.

- Los linfocitos T reactivos a tumores se enriquecen adicionalmente mediante separación o selección de células que expresan uno o más marcadores de regulación positiva, tal como un marcador de activación, asociado con linfocitos
- 40 T reactivos a tumores (la separación o selección adicional produce una cuarta población de linfocitos T de los linfocitos T reactivos a tumores enriquecidos). Los marcadores de activación de linfocitos T pueden incluir marcadores de superficie celular cuya expresión está regulada positivamente o es específica de linfocitos T que han sido expuestos a antígeno y activados. A continuación se describen ejemplos de tales marcadores.

- 45 En realizaciones particulares, los métodos proporcionados incluyen el enriquecimiento a partir de una muestra biológica (obtenida directamente de una muestra *in vivo* o de un cocultivo *ex vivo* con células presentadoras de antígeno (APC)) con linfocitos T que tienen un TCR endógeno que reconoce antígenos asociados a tumores, por ejemplo, neoantígenos, tal como seleccionando linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T (por ejemplo, CD107, CD107a, CD039, CD134, CD137, CD59, CD69, CD90, CD38 o
- 50 CD103).

- En realizaciones particulares, se realiza una segunda expansión de linfocitos T enriquecidos o aislados del cocultivo, tal como después de la separación o selección de linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores. La
- 55 segunda expansión implica la incubación para estimular aún más los linfocitos T con uno o más agentes estimuladores de linfocitos T, en donde el agente estimulador de linfocitos T es o comprende IL-2, y el agente estimulador de linfocitos T comprende opcionalmente agente(s) estimulador(es) de linfocitos T adicionales tales como anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT3), anticuerpo anti-CD28 y citocina(s) recombinante(s) adicional(es) (por ejemplo, IL-7, IL-21 y/o IL-15). Los linfocitos T, tales como linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores
- 60 de superficie de activación de linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores, se les permite expandirse durante un cierto número de días según se desee y/o hasta que se alcance una dosis terapéutica o una dosis de cosecha. La composición de linfocitos T expandidos puede después recolectarse y formularse para administración a un sujeto para el tratamiento de un cáncer en el sujeto.

- 65 Los linfocitos T que contienen un TCR endógeno se enriquecen separando las células presentadoras de antígeno de la población de linfocitos T. Dichas células se enriquecen seleccionando linfocitos T que son positivos para uno o más

- 5 marcadores de superficie de activación asociados con linfocitos T reactivos a tumores. Se realiza una segunda expansión de linfocitos T enriquecidos o aislados del cocultivo, tal como después de la separación o selección de linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores. La segunda expansión implica la incubación para estimular aún más los linfocitos T con uno o más agentes estimuladores de linfocitos T, en donde el agente estimulador de linfocitos T es o comprende IL-2, y opcionalmente comprende además agentes estimuladores de linfocitos T tales como anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT3), anticuerpo anti-CD28 y citocina(s) recombinante(s) (por ejemplo, IL-7, IL-21 y/o IL-15).
- 10 Una o más de las etapas se pueden llevar a cabo en medios sin suero. En una realización, el medio sin suero es OpTmizer CTS (LifeTech), Immunocult XF (Stemcell technologies), CellGro (CellGenix), TexMacs (Miltenyi), Stemline (Sigma), Xvivo15 (Lonza), PrimeXV (Irvine Scientific), o Stem XVivo (RandD systems). El medio sin suero se puede complementar con un sustituto del suero como ICSR (reemplazo de suero de células inmunitarias) de LifeTech. El nivel de sustituto del suero (p. ej., ICSR) puede ser, p. ej., hasta el 5 %, p. ej., aproximadamente el 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 %. En algunas realizaciones, el medio sin suero contiene de 0,5 mM a 5 mM de una forma dipéptido de L-glutamina, como la L-alanil-L-glutamina (Glutamax™). En algunas realizaciones, la concentración de la forma dipéptido de L-glutamina, como L-alanil-L-glutamina, es de o de aproximadamente 0,5 mM a 5 mM, 0,5 mM a 4 mM, 0,5 mM a 3 mM, 0,5 mM a 2 mM, 0,5 mM a 1 mM, 1 mM a 5 mM, 1 mM a 4 mM, 1 mM a 3 mM, 1 mM a 2 mM, 2 mM a 5 mM, 2 mM a 4 mM, 2 mM a 3 mM, 3 mM a 5 mM, 3 mM a 4 mM o 4 mM a 5 mM, cada uno inclusive. En algunas realizaciones, la concentración de la forma dipéptido de L-glutamina, como L-alanil-L-glutamina, es o es aproximadamente 2 mM.
- 25 En relación con los métodos proporcionados, los métodos dan como resultado el enriquecimiento de linfocitos T que contienen un TCR endógeno específico de un antígeno asociado a tumores para maximizar la expansión de las células terapéuticas deseadas. Los linfocitos T, tales como los linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de la regulación positiva de linfocitos T o marcadores de activación asociados con linfocitos T reactivos a tumores, se les permite expandirse durante un cierto número de días según se desee y/o hasta que se alcance una dosis terapéutica o una dosis de cosecha. La composición de linfocitos T expandidos puede después recolectarse y formularse para administración a un sujeto para el tratamiento de un cáncer en el sujeto.

A. Identificación de neoepítos y generación de péptidos

- 35 Los métodos proporcionados incluyen una etapa de generar o identificar por simulación en ordenador una pluralidad de péptidos (también denominados "P" o "n unidades") que contienen al menos un neoepítoto de cáncer específico del cáncer, y una etapa adicional de filtrar por simulación en ordenador los péptidos para obtener así un subconjunto de secuencias de neoepítotos. En algunas realizaciones, al menos un péptido sintético se prepara usando información de secuencia del subconjunto de secuencias de neoepítotos, y luego el péptido sintético se emplea en métodos para enriquecer linfocitos T reactivos a tumores de acuerdo con los métodos proporcionados.
- 40 En algunas realizaciones, el neoepítoto de cáncer específico de cáncer se determina identificando o aislando un antígeno asociado a tumor o una secuencia peptídica del mismo de una célula cancerosa de un sujeto. La célula cancerosa puede obtenerse de cualquier muestra corporal derivada de un paciente que contenga o se espere que contenga células tumorales o cancerosas. La muestra corporal puede ser cualquier muestra de tejido tal como sangre, una muestra de tejido obtenida del tumor primario o de metástasis tumorales, una muestra de ganglio linfático o cualquier otra muestra que contenga células tumorales o cancerosas.
- 45 En algunas realizaciones, el tumor es un tumor hematológico. Ejemplos no limitantes de tumores hematológicos incluyen leucemias, incluidas las leucemias agudas (como leucemia aguda positiva para Iq23, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de la cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.
- 50 En algunas realizaciones, el tumor es un tumor sólido. Ejemplos no limitativos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfoide, cáncer pancreático, cáncer de mama (incluido carcinoma de mama basal, carcinoma ductal y carcinoma de mama lobulillar), cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello de útero, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores del SNC (tales como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma,

melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). En varios ejemplos, un tumor es melanoma, cáncer de pulmón, linfoma, cáncer de mama o cáncer de colon.

5 En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer gastrointestinal que implica un cáncer del tracto gastrointestinal (tracto GI), incluyendo cánceres del tracto digestivo superior o inferior, o un órgano accesorio de la digestión, como el esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, recto o ano. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer esofágico, cáncer de estómago (gástrico), cáncer pancreático, cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular), cáncer de vesícula biliar, cáncer del tejido linfoide asociado a las mucosas (linfoma MALT), cáncer del árbol biliar, cáncer colorrectal (incluido cáncer de colon, cáncer de recto o ambos), cáncer anal o un tumor carcinoide gastrointestinal. En realizaciones particulares, el cáncer es un cáncer colorrectal.

15 En algunas realizaciones, el tumor es de un cáncer de mama, tal como un carcinoma ductal o un carcinoma lobulillar. En algunas realizaciones, el tumor es de un cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el tumor es de un cáncer de piel, tal como un carcinoma de células basales, un carcinoma de células escamosas, un sarcoma de Kaposi, o un melanoma. En algunas realizaciones, el tumor es de un cáncer de pulmón, tal como un adenocarcinoma, un carcinoma bronquioloalveolar, un carcinoma de células grandes o un carcinoma de células pequeñas. En algunas realizaciones, el tumor es de un cáncer cerebral, tal como un glioblastoma o un meningioma. En algunas realizaciones, el tumor es de un cáncer gastrointestinal, tal como cualquiera de los descritos anteriormente. En algunas realizaciones, el tumor es de un cáncer de colon. En algunas realizaciones, el tumor es de un cáncer de hígado, tal como un carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones, el tumor proviene de un cáncer de páncreas. En algunas realizaciones, el tumor es de un cáncer de riñón, tal como, por ejemplo, un carcinoma de células renales. En algunas realizaciones, el tumor es de un cáncer testicular.

25 En algunas realizaciones, el cáncer no es un melanoma. El melanoma es un cáncer que generalmente tiene una alta tasa de mutación. Se ha pensado que una alta carga de mutaciones tumorales es un marcador pronóstico particularmente deseado para el éxito relacionado con el tratamiento con una inmunoterapia dirigida a neoantígenos tumorales (Simpson *et al.*, Journal of Clinical Oncology 2017, 35:15_suppl, 9567-9567; McGranahan *et al.* Science 2016, 351:1463-1469). En algunas realizaciones, los métodos proporcionados se pueden utilizar en cánceres que tienen una menor carga de mutaciones tumorales, ya que los métodos se llevan a cabo para enriquecer activamente (en lugar de pasivamente) linfocitos T reactivos a tumores.

35 En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto con una carga mutacional tumoral (TMB) de menos de 8 mutaciones. La TMB incluye el número de mutaciones no sinónimas por tumor. En algunas realizaciones, la TMB se puede calcular contando el número de mutaciones sinónimas y no sinónimas en una región de 0,8 a 1,2 megabases (Mb) y expresando el resultado como mutaciones/Mb. En algunas realizaciones, la TMB se puede determinar mediante secuenciación de próxima generación (NGS) en muestras de tejido tumoral. En algunos casos, se puede utilizar la secuenciación completa del exoma o el filtrado por ordenador del estado de la línea germinal (Chalmers *et al.* Genome Med 2017 9:34). En algunas realizaciones, el sujeto tiene una TMB de menos de o aproximadamente 60 mutaciones/Mb, tal como menos de o aproximadamente 55 mutaciones/Mb, menos de o aproximadamente 50 mutaciones/Mb, menos de o aproximadamente 45 mutaciones/Mb, menos de o aproximadamente 40 mutaciones/Mb, menos de o aproximadamente 30 mutaciones/Mb, menos de o aproximadamente 25 mutaciones por Mb, o menos de o aproximadamente 20 mutaciones/Mb, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una TMB de menos de o aproximadamente 41 mutaciones/Mb, menos de o aproximadamente 40 mutaciones/Mb, menos de o aproximadamente 39 mutaciones/Mb, menos de o aproximadamente 38 mutaciones/Mb, menos de o aproximadamente 37 mutaciones/Mb o menos.

50 En algunas realizaciones, el péptido (P) es un antígeno asociado a tumores derivado de afecciones premalignas, tales como variantes de carcinoma *in situ* o neoplasia intraepitelial vulvar, neoplasia intraepitelial cervical o neoplasia intraepitelial vaginal.

55 En algunos aspectos, se obtiene y se secuencia el ácido nucleico de dichas células del tumor o cáncer. En las realizaciones, se obtiene la región codificante de proteínas de los genes de un genoma, tal como mediante análisis ómicos, tal como mediante el análisis de los datos de la secuenciación genómica completa, datos de secuenciación del exoma y/o datos del transcriptoma. Para identificar secuencias específicas de tumores, los datos de secuenciación se pueden comparar con datos de secuenciación de referencia, tales como los datos obtenidos de una célula normal o de una célula no cancerosa del mismo sujeto. En algunas realizaciones, se utilizan métodos de secuenciación de próxima generación (NGS).

60 En algunas realizaciones, los métodos incluyen una etapa de utilizar datos ómicos normales emparejados con los de un tumor. En dichos métodos, el análisis por ordenador implica un análisis ómico para identificar mutaciones en el tumor respecto al tejido normal del mismo paciente, tal como tejido no afectado del mismo paciente. Generalmente se contempla que los datos ómicos normales emparejados son datos de la secuenciación genómica completa, datos de secuenciación del exoma y/o datos del transcriptoma, y que los datos ómicos normales emparejados se comparan con los normales antes del tratamiento del paciente. En una realización particular, la secuenciación completa del exoma se realiza en tejido sano y afectado para identificar mutaciones somáticas asociadas con el tumor.

65

En algunas realizaciones, los datos ómicos se obtienen de una o más muestras de biopsia de pacientes siguiendo un protocolo estándar de procesamiento de tejidos y protocolos de secuenciación. En realizaciones particulares, los datos son datos de tumores emparejados de pacientes (p. ej., tumor frente a normal del mismo paciente). En algunos casos, también se consideran adecuados para usar en el presente documento referencias no emparejadas o emparejadas frente a otras referencias (por ejemplo, previa normal del mismo paciente o previa del tumor del mismo paciente u homo statisticus). Los datos ómicos pueden ser datos ómicos nuevos o datos ómicos que se obtuvieron de un procedimiento anterior (o incluso de un paciente diferente). Por ejemplo, los neoepítomos pueden identificarse a partir de un tumor de un paciente en una primera etapa mediante el análisis del genoma completo y/o del exoma de una biopsia de tumor (o biopsia linfática o biopsia de un sitio metastásico) y tejido normal compatible (es decir, tejido no afectado del mismo paciente tal como sangre periférica). En algunas realizaciones, el análisis genómico se puede procesar mediante una comparación sincrónica guiada por la ubicación de la información ómica así obtenida.

El análisis genómico se puede realizar mediante cualquier número de métodos analíticos. En realizaciones particulares, los métodos incluyen WGS (secuenciación del genoma completo) y secuenciación del exoma tanto del tumor como de la muestra normal emparejada utilizando secuenciación de próxima generación, tales como métodos de secuenciación masiva paralela, secuenciador Ion Torrent, pirosecuenciación. El análisis por ordenador de los datos de secuencia se puede realizar de numerosas maneras. En algunas realizaciones, el formato de datos está en formato SAM, BAM, GAR o VCF. Como ejemplo, se puede realizar el análisis por ordenador mediante alineación sincrónica guiada por la ubicación de muestras tumorales y normales como, por ejemplo, se divulga en los documentos US 2012/0059670A1 y US 2012/0066001 A1 utilizando archivos BAM y servidores BAM. Los formatos de archivo alternativos para análisis de secuencia (p. ej., SAM, GAR, FASTA, etc.) también se contemplan.

En algunas de las realizaciones, los péptidos (P) que comprenden neoantígenos que surgen de una mutación sin sentido abarcan el cambio de aminoácido codificado por 1 o más polimorfismos de nucleótidos. Los péptidos (P) que comprenden neoantígenos que surgen de mutaciones de cambio de marco, variantes del sitio de corte y empalme, inserciones, inversiones y deleciones deben abarcar las nuevas secuencias peptídicas y las uniones de nuevas secuencias peptídicas. Los péptidos (P) que comprenden neoantígenos con nuevas modificaciones postraduccionales deben abarcar los aminoácidos que llevan la(s) modificación(es) postraduccionales(es), tal como un fosfato o glicano.

Una vez identificadas estas mutaciones, se identifican los neoepítomos. Los neoepítomos son péptidos mutantes que son reconocidos por los linfocitos T de un paciente. Estos neoepítomos deben ser presentados por un tumor o una célula presentadora de antígeno por el complejo MHC y después deben ser reconocidos por un TCR en el linfocito T. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados incluyen una etapa de cálculo de uno o más neoepítomos para definir neoepítomos que son específicos del tumor y del paciente. Por consiguiente, debe reconocerse que los neoepítomos específicos de pacientes y cáncer pueden identificarse a partir de información ómica de forma exclusivamente en un entorno informático que en última instancia predice epítomos potenciales que son exclusivos del paciente y del tipo de tumor. En aspectos particulares, los neoepítomos de cáncer así identificados son exclusivos del paciente y del cáncer particular del paciente (por ejemplo, tienen una frecuencia de menos del 0,1 % de todos los neoepítomos y, más usualmente, menos del 0,01 % en una población de pacientes con cáncer diagnosticados con el mismo cáncer), salvo que los neoepítomos cancerosos así identificados tienen una alta probabilidad de presentarse en un tumor.

En algunas de las realizaciones, la longitud del péptido (P) depende de la aplicación específica y normalmente está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 aminoácidos. En las realizaciones preferidas, el péptido (P) tiene entre aproximadamente 7 y 35 aminoácidos, p. ej., 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 o 35 aminoácidos. En algunos aspectos, los métodos se pueden llevar a cabo con un péptido individual que incluye uno o más cambios (por ejemplo, mutaciones) en las secuencias de aminoácidos. En algunos aspectos, los métodos se pueden llevar a cabo con un grupo de péptidos, donde los péptidos del grupo contienen cambios (por ejemplo, mutaciones) en las secuencias de aminoácidos. El grupo de péptidos puede incluir de decenas a cientos de péptidos individuales. En algunos casos, el grupo de péptidos incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más péptidos individuales, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores. El grupo de péptidos puede representar un neoantígeno o puede representar varios neoantígenos. En algunos casos, un grupo de péptidos puede incluir múltiples péptidos superpuestos del mismo neoantígeno. Por tanto, para un antígeno asociado a tumores, el antígeno puede dividirse en 7 a 35 aminoácidos, p. ej., 25 aminoácidos, péptidos (P) en donde cada péptido (P) contiene una composición única de aminoácidos; o, los péptidos (P) pueden ser grupos de péptidos superpuestos en donde un antígeno se divide en un número determinado de 7 a 35 aminoácidos, p. ej., 25 aminoácidos, péptidos (P) que tienen secuencias superpuestas. En algunos casos, cada uno de los péptidos del grupo superpuesto de un antígeno puede estar desplazado por un número determinado de restos de aminoácidos, tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 o 15 aminoácidos. En algunas realizaciones, cada uno de los péptidos del grupo superpuesto de un antígeno está desplazado por 10 aminoácidos. En algunas realizaciones, cada uno de los péptidos del grupo superpuesto de un antígeno está desplazado por 12 aminoácidos. Por ejemplo, un grupo de péptidos superpuestos que comprende un antígeno de 100 aminoácidos se puede dividir en ocho péptidos de 25 aminoácidos (P), cada uno de los cuales está desplazado por 12 aminoácidos (es decir, cada péptido de 25 aminoácidos posterior que comprende una secuencia peptídica de 100 aminoácidos comienza en la posición 13^a del aminoácido del péptido anterior). Los expertos en la materia entienden que existen muchas permutaciones para generar un grupo de péptidos a partir de un antígeno.

Las secuencias de neoepítomos contempladas en el presente documento pueden definirse como tramos de secuencia con una longitud relativamente corta (por ejemplo, 5-30 unidades, más usualmente 7-11 unidades, o 12-25 unidades) en donde dichos tramos incluyen los cambios (por ejemplo, mutaciones) en las secuencias de aminoácidos. Lo más usualmente, los cambios están ubicados centralmente o cerca del centro (p. ej., menos de 4, o menos de 5, o menos de 6 aminoácidos respecto a la posición central). En aspectos particulares, las secuencias de neoepítomo contempladas en el presente documento incluirán especialmente aquellas en las que se intercambia un único aminoácido con respecto a la secuencia normal emparejada, y en las que la posición del aminoácido cambiado está ubicada centralmente, o cerca del centro de la secuencia de neoepítomo (por ejemplo, en un 9 mero, el aminoácido cambiado está en la posición 2, 3, 4 o 5, y más usualmente en la posición 3, 4 o 5, y más usualmente en la posición 4 o 5). Debe apreciarse que un único cambio de aminoácido puede presentarse en numerosas secuencias de neoepítomos que incluyen el aminoácido cambiado, dependiendo de la posición del aminoácido cambiado.

En realizaciones particulares, se calculará que los neoepítomos tienen una longitud de entre 2 y 50 aminoácidos, más usualmente entre 5 y 30 aminoácidos, y más usualmente entre 9 y 15 aminoácidos. Por ejemplo, cuando el epítomo debe ser presentado por el complejo MHC-I, la longitud típica de un epítomo será de aproximadamente 8 a 11 aminoácidos, mientras que el epítomo típico para la presentación a través del complejo MHC-II tendrá una longitud de aproximadamente 13 a 17 aminoácidos. Como se apreciará fácilmente, dado que la posición del aminoácido cambiado en el neoepítomo puede ser distinta de la central, la secuencia peptídica real y con ella la topología real del neoepítomo pueden variar considerablemente. Por otra parte, cuando el neoepítomo se presenta a una célula inmunocompetente (u otra) como un péptido sintético, debe apreciarse que el péptido sintético puede ser significativamente más largo que la porción peptídica que finalmente está unida por el sistema MHC-I o MHC-II para permitir así el procesamiento proteolítico en la célula. Por ejemplo, los péptidos sintéticos contemplados pueden tener, por lo tanto, entre 8 y 15 aminoácidos en la dirección 5' y 3' del aminoácido modificado.

Se han desarrollado varios algoritmos que pueden usarse para cartografiar epítomos de linfocitos T (restringidos tanto al MHC de clase I como de clase II) dentro de moléculas de proteínas de diversos orígenes. En algunas realizaciones, muchos programas utilizan la disponibilidad de la matriz de afinidad de unión de péptido-MHC a gran escala a partir de mediciones experimentales para entrenar clasificadores basados en aprendizaje automático (ML) para distinguir los que se unen a MHC de los que no (véase, por ejemplo, Zhao *et al.* (2018) PLoS Comput Biol 14(11): e1006457). Los métodos de predicción de ejemplo para el MHC de clase I (por ejemplo, 9 unidades) incluyen *smm*, *smmpmbec*, *ann* (NetMHC3.4), NetMHC4, PickPocket, consenso, NetMHCpan2.8, NetMHCpan3, NetMHCpan4, NetMHCcons, mhclflurry, mhclflurry_pan o MixMHCpred. Los métodos de predicción de ejemplo para MHC clase II (por ejemplo, 15 unidades) incluyen NetMHCIIpan, NetMHCII2.3, nn_align, *smm_align*, consenso, comblib, tepitope, o mhclflurry. Se puede utilizar cualquiera de estos métodos.

En realizaciones en las que el péptido sintético se usa para la unión directa al MHC-I, la longitud total será de entre 8 y 10 aminoácidos. En las realizaciones, donde el péptido sintético se utiliza para la unión directa al MHC-II, la longitud total será de entre 12 y 25 aminoácidos, tal como por ejemplo entre 14 y 20 aminoácidos. En algunos casos, donde el péptido sintético se procesa en la célula (normalmente mediante procesamiento del proteasoma) antes de la presentación del MHC, la longitud total normalmente será de entre 10 y 40 aminoácidos, con el aminoácido cambiado en o cerca de una posición central en el péptido sintético. En algunas realizaciones, un péptido para la unión al MHC-I tiene 9 unidades. En algunas realizaciones, un péptido para la unión al MHC-II tiene 23 unidades. En algunas realizaciones, un péptido para la unión al MHC-II tiene 25 unidades.

Como ejemplo, un péptido (P) puede incluir 0-25 aminoácidos en cada lado que flanquean el cambio de aminoácido o la nueva unión que surge debido a una mutación. En una realización, el péptido (P) es una secuencia de neoantígeno que comprende los 12 aminoácidos a cada lado que flanquean el cambio de aminoácidos que surge de un polimorfismo de un solo nucleótido, por ejemplo, un péptido de 25 aminoácidos, en donde el 13^º aminoácido es el resto de aminoácido resultante del polimorfismo de un solo nucleótido. En algunas realizaciones, el péptido (P) es una secuencia de neoantígeno que comprende los 12 aminoácidos a cada lado que flanquean un aminoácido con una nueva modificación postraducciona, por ejemplo, un péptido de 25 aminoácidos, donde el 13^º aminoácido es el resto de aminoácido resultante del nuevo sitio de modificación postraducciona. En otras realizaciones, el péptido (P) es una secuencia de neoantígeno que comprende 0-12 aminoácidos a cada lado que flanquean una nueva unión creada por una inserción, delección o inversión. En algunos casos, el péptido (P) que comprende neoantígenos resultantes de secuencias novedosas puede abarcar la secuencia novedosa completa, incluyendo 0-25 aminoácidos a cada lado de nuevas uniones que también pueden surgir.

En algunas realizaciones, se pueden realizar análisis posteriores adicionales sobre las diferencias de secuencia así identificadas para identificar aquellas que conducen a una nueva secuencia peptídica basada en la mutación específica del cáncer y del paciente. Por lo tanto, los neoepítomos pueden identificarse considerando el tipo (p. ej., delección, inserción, transversión, transición, translocación) y el impacto de la mutación (por ejemplo, sin sentido, de sentido erróneo, desplazamiento del marco, etc.), y como tal puede servir como un filtro de contenido a través del cual se eliminan mutaciones silenciosas y otras mutaciones no relevantes (por ejemplo, no expresadas).

En algunas realizaciones, los neoepítosos identificados se pueden filtrar aún más por ordenador contra un tipo HLA de un paciente identificado. Se cree que dicha coincidencia de HLA garantiza una fuerte unión de los neoepítosos al complejo MHC-I de células nucleadas y al complejo MHC-II de células presentadoras de antígeno específicas. Se cree que dirigirse a ambos sistemas de presentación de antígenos produce una respuesta inmunitaria terapéuticamente eficaz y duradera que implica tanto las ramas celular como humoral del sistema inmunitario. También se debe apreciar que los neoepítosos HLA coincidentes identificados de esta manera pueden validarse bioquímicamente *in vitro*.

La determinación del HLA tanto para MHC-I como para MHC-II se puede realizar mediante varios métodos. En algunas realizaciones, el tipo HLA se puede predecir por ordenador a partir de datos ómicos usando una secuencia de referencia que contiene la mayoría o todos los tipos de HLA conocidos y/o comunes. Por ejemplo, se determina el tipo HLA de un paciente (por química húmeda o mediante determinación por ordenador), y se calcula u obtiene una solución estructural para el tipo HLA a partir de una base de datos, que luego se utiliza como modelo de acoplamiento por ordenador para determinar la afinidad de unión del neoepítoso a la solución estructural de HLA. Los sistemas adecuados para la determinación de afinidades de unión incluyen la plataforma NetMHC (véase, por ejemplo, Nucleic Acids Res. 1 de julio de 2008; 36 (Web Server issue): W509-W512.), HLAMatchmaker (<http://www.epitopes.net/downloads.html>) e IEDB Analysis Resource (<http://tools.immuneepitope.org/mhcii/>). A continuación se seleccionan los neoepítosos con alta afinidad (p. ej., menos de 100 nM, menos de 75 nM, menos de 50 nM para MHC-I; menos de 500 nM, menos de 300 nM, menos de 100 nM para MHC-II) frente al tipo HLA previamente determinado. Al calcular la mayor afinidad, se pueden implementar modificaciones en los neoepítosos añadiendo modificaciones N- y/o C-terminales al epítoso para aumentar aún más la unión de un neoepítoso sintético al tipo HLA del paciente. Por tanto, los neoepítosos pueden ser nativos tal como se identifican o modificarse adicionalmente para que coincidan mejor con un tipo de HLA particular. En algunas realizaciones, los neoepítosos se pueden calificar/clasificar según la frecuencia de los alelos multiplicada por los transcritos por número de millón para obtener una puntuación de probabilidad. A continuación, esta puntuación se puede aumentar aún más utilizando la información de HLA y la afinidad de unión calculada o real con el tipo de HLA del paciente.

Entre las realizaciones proporcionadas se encuentran realizaciones en las que los neoepítosos se comparan con una base de datos que contiene secuencias humanas conocidas para evitar así el uso de una secuencia idéntica a la humana.

Después de la identificación por ordenador de las secuencias de los neoepítosos adecuados, se preparan a continuación los péptidos sintéticos correspondientes *in vitro* (p. ej., usando síntesis en fase sólida). En realizaciones particulares, se prepara una biblioteca de péptidos sintéticos que representan una pluralidad de neoepítosos diferentes del sujeto. La biblioteca puede incluir 100, 1000, 10000 o más péptidos diferentes. Para obtener un anticuerpo sintético contra el o los neoepítosos identificados, se contempla que se prepare el epítoso identificado *in vitro* para producir un péptido sintético.

Se pueden usar diversos métodos para preparar péptidos sintéticos. Por ejemplo, se pueden preparar péptidos con secuencias de neoepítosos de cáncer en una fase sólida (por ejemplo, usando síntesis Merrifield), mediante síntesis en fase líquida, o a partir de fragmentos peptídicos más pequeños. Los epítosos peptídicos se pueden obtener mediante síntesis química utilizando un sintetizador de péptidos automatizado comercializado. En algunas realizaciones, los péptidos se pueden sintetizar, por ejemplo, utilizando el modo Fmoc-poliámidas de síntesis de péptidos en fase sólida que se describe por Lu et al (1981). J. Org. Chem. 46,3433 y las referencias allí contenidas. En algunos aspectos, los péptidos pueden producirse mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante en un hospedador adecuado y con un sistema de expresión adecuado. En algunos aspectos, se pueden utilizar métodos recombinantes cuando hay múltiples neoepítosos en una única cadena peptídica, tal como con espaciadores entre neoepítosos o sitios de escisión).

Los péptidos pueden purificarse mediante una cualquiera de las técnicas o una combinación de ellas, tales como recristalización, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa utilizando, por ejemplo, separación en gradiente de acetonitrilo/agua. En algunas realizaciones, los péptidos se pueden precipitar y purificar aún más, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis de péptidos se puede realizar mediante cromatografía en capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa, análisis de aminoácidos después de la hidrólisis ácida y mediante análisis espectrométrico de masas por bombardeo atómico rápido (FAB), así como análisis espectrométrico de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

B. Selección y estimulación de una población de linfocitos T

Los métodos proporcionados incluyen la obtención y el enriquecimiento o la selección de una población de linfocitos T a partir de una muestra biológica para usar como población primera o de entrada de linfocitos T. En algunos casos, la primera población de linfocitos T es aquella que se sabe o es probable que contenga linfocitos T reactivos a un antígeno tumoral o que son capaces de ser reactivos a un antígeno tumoral, como después de un cocultivo *ex vivo* con una fuente autóloga de antígeno tumoral. Por ejemplo, normalmente, la primera población de linfocitos T procede de una muestra biológica de un tumor. La muestra biológica es de un sujeto con un tumor. La primera población de

linfocitos T se estimula adicionalmente con uno o más agentes estimuladores de linfocitos T (por ejemplo, una o más citocinas recombinantes), en un sistema cerrado utilizando medio sin suero, en donde el uno o más agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante, para producir una población segunda o estimulada de linfocitos T que contiene linfocitos T que se han expandido después de la estimulación.

5 En algunas realizaciones, la incubación con el o los agentes estimuladores de linfocitos T se lleva a cabo directamente sobre una entrada o primera población de linfocitos T seleccionados de una muestra biológica de un sujeto, en donde la población de linfocitos T seleccionados de la muestra biológica (por ejemplo, linfocitos T autólogos del sujeto) se
10 incuba con el o los agentes estimuladores de linfocitos T. En otras realizaciones, la población de entrada de linfocitos T incluye linfocitos T que probablemente sean o se sospeche que son linfocitos T reactivos a tumores, en la que dichas células se seleccionan primero de una población de linfocitos T seleccionados de una muestra biológica de un sujeto seleccionando células positivas para un marcador de superficie que está regulado positivamente en linfocitos T
15 activados (por ejemplo, 4-1BB u OX40). En dichas realizaciones, la incubación con el o los agentes estimuladores de linfocitos T se lleva a cabo después del enriquecimiento para la población de linfocitos T que comprende linfocitos T reactivos a tumores. En las realizaciones proporcionadas, la incubación con el o los agentes estimuladores de linfocitos T se lleva a cabo antes del cocultivo de tales linfocitos T (linfocitos T estimulados) con las APC/neoepítomos peptídicos.

20 En algunos casos, las condiciones para estimular los linfocitos T mediante cultivo con uno o más agentes estimuladores de linfocitos T dan como resultado la activación de las células y la expansión o crecimiento de los linfocitos T presentes en la primera población de linfocitos T o en la de entrada. En algunas realizaciones, las condiciones para estimular los linfocitos T con uno o más agentes estimuladores de linfocitos T pueden incluir cultivar los linfocitos T en condiciones que den como resultado una expansión masiva de los linfocitos T.

25 En los métodos proporcionados, la composición estimulada de linfocitos T se emplea a continuación en etapas posteriores para el enriquecimiento y la expansión de linfocitos T reactivos a tumores, incluyendo etapas que incluyen el cocultivo de los linfocitos T estimulados con células presentadoras de antígeno (APC) en presencia de antígenos peptídicos de neopítomo (mutados) de linfocitos T para producir, rendir o extraer linfocitos T que son linfocitos T reactivos a tumores. Los métodos proporcionados también incluyen una etapa para seleccionar o enriquecer linfocitos
30 T reactivos a un antígeno tumoral (linfocitos T reactivos a tumores), después de cocultivar linfocitos T con APC/neoepítomos peptídicos. Las poblaciones de linfocitos T reactivos a tumores se cultivan en condiciones de expansión, tal como para producir una composición terapéutica de linfocitos T.

35 La entrada o primera población de linfocitos T se incuba en presencia de uno o varios agentes estimuladores de linfocitos T. La incubación se lleva a cabo en condiciones en las que el agente estimulador de linfocitos T activa o estimula las células o promueve la expansión de los linfocitos T presentes en la entrada o primera población de linfocitos T.

40 En algunas realizaciones, el o los agentes estimuladores de linfocitos T incluyen una citocina estimulante de linfocitos T recombinante adicional, tales como IL-7, IL-15 y/o IL-21. La citocina estimulante de los linfocitos T incluye IL-2, opcionalmente sola o en combinación con otra citocina de entre IL-7, IL-15 y/o IL-21.

45 En algunas realizaciones, el o los agentes estimuladores de linfocitos T pueden incluir adicionalmente un agente o agentes que se acoplan a CD3 y/o una molécula coestimuladora, tal como CD28. El o los agentes estimuladores de linfocitos T pueden incluir un anticuerpo anti-CD3, tal como OKT3 y/o un agente anti-CD28 (presentado por las APC o como un anticuerpo soluble). En las realizaciones, antes y/o durante al menos una parte del cocultivo de linfocitos T con APC, los linfocitos T seleccionados de la muestra biológica (es decir, entrada o primera población) se incuban en presencia de uno o más agentes estimuladores de linfocitos T, tal como un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT3)/anti-CD28. Por tanto, ya sea antes del cocultivo en presencia de APC o después de la selección de células reactivas, los linfocitos T se incuban con uno o más agentes estimulantes de linfocitos T, tales como, entre otros,
50 anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT3) y anti-CD28 (presentado por las APC o como anticuerpos solubles), para producir una segunda población de linfocitos T que incluye linfocitos T activados o estimuladas. En realizaciones particulares, también están presentes una o más citocinas recombinantes como agentes estimuladores de linfocitos T adicionales durante la incubación.

55 En algunas realizaciones, la incubación con uno o más agentes estimuladores de linfocitos T, tal como un anticuerpo anti-CD3/anti-CD28, puede continuarse durante un período de tiempo suficiente para activar o estimular las células. En algunas realizaciones, la incubación con el o los agentes estimuladores de linfocitos T, tal como un anticuerpo anti-CD3/anti-CD28, se lleva a cabo durante o aproximadamente 1 día, tal como generalmente durante o aproximadamente
60 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, o cualquier intervalo de tiempo entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante 7-10 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 7 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 8 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 9 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 10 días. En algunas realizaciones, la incubación con el o los agentes estimuladores de linfocitos T, tales como anticuerpo anti-CD3/anti-CD28, en algunos casos una o más citocinas recombinantes, dura de 12 horas a
65 96 horas, tal como de 24 horas a 48 horas, y generalmente o aproximadamente 48 horas.

En algunas realizaciones, las células se lavan una o más veces durante el cultivo para eliminar los agentes presentes durante la incubación o el cultivo y/o para reponer el medio de cultivo con uno o más agentes adicionales. En algunas realizaciones, las células se lavan durante la incubación o el cultivo para reducir o eliminar el agente estimulador de linfocitos T antes de completar el cultivo.

En algunas realizaciones, los métodos para estimular los linfocitos T proporcionados en el presente documento incluyen la incubación con uno o más agentes estimuladores de linfocitos T a una temperatura adecuada para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 grados Celsius, generalmente al menos aproximadamente 30 grados, y generalmente a o aproximadamente 37 grados Celsius. En algunas realizaciones, los métodos de cultivo o incubación se llevan a cabo en medios sin suero.

1. Selección de una población de linfocitos T

Los métodos proporcionados incluyen procesar una muestra biológica que contiene una población de células linfocitos T obtenidos de un sujeto donante que tiene un tumor para producir una primera población de células linfocitos T. En algunas realizaciones, el procesamiento incluye seleccionar u obtener una población de linfocitos T a partir de una muestra biológica, que puede usarse como la fuente o entrada de linfocitos T para estimulación con uno o más agentes estimuladores de linfocitos T, incluyendo IL-2 recombinante y opcionalmente, por ejemplo, anti-CD3/anti-CD28. En algunas realizaciones, los linfocitos T proceden de una muestra biológica de un sujeto que se sabe o probablemente contiene linfocitos T reactivos a tumores. La muestra biológica recogida contiene o se sospecha que contiene linfocitos que tienen TCR endógenos que reaccionan a mutaciones presentes en un tumor.

En los aspectos de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, se obtiene una muestra biológica adecuada de un sujeto, tal como de un paciente de interés, es decir, un paciente sospechoso de tener o que se sabe que tiene cáncer. En algunas realizaciones, la muestra es una que se sabe o se sospecha que contiene linfocitos T, tales como linfocitos T que pueden expresar o probablemente expresan un receptor de linfocitos T endógeno (TCR) que es específico de, se une o reconoce un antígeno asociado a un tumor. La muestra puede derivarse de cualquier fuente inicial que contenga o se sospeche que contiene dichos linfocitos T. En algunos aspectos, las fuentes de muestras biológicas de interés incluyen, pero no se limitan a, muchas fuentes fisiológicas diferentes, por ejemplo, muestras derivadas de tejido, por ejemplo, homogeneizados, y sangre o derivados de los mismos.

Puede usarse cualquiera de una variedad de muestras como fuente de linfocitos T potencialmente reactivos. Aunque el tumor y los ganglios linfáticos posteriores pueden tener la mayor frecuencia de linfocitos T reactivos (Powell *et al.*, Clin. Cancer. Res., 2014), también se pueden utilizar otras fuentes de muestra. En algunos casos la muestra es una muestra de tumor, un sitio linfoide terciario, un ganglio linfático que drena, sangre periférica o médula ósea. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra tumoral. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra linfática. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre periférica.

Las muestras incluyen tejido, fluido y otras muestras tomadas directamente del sujeto, así como muestras resultantes de una o más etapas de procesamiento, tales como la separación, por ejemplo, la selección o el enriquecimiento, la centrifugación, el lavado y/o la incubación. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra que se procesa. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, fluidos corporales, tal como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos, incluidas las muestras procesadas obtenidas de los mismos.

En algunos aspectos, la muestra es sangre o una muestra derivada de sangre, o es o se deriva de un producto de aféresis o leucoféresis. Las muestras ilustrativas incluyen sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglio linfático, tejido linfoide asociado al intestino, tejido linfoide asociado a mucosas, bazo, otros tejidos linfoides, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello uterino, testículos, ovarios, amígdala u otro órgano y/o células derivadas de los mismos. Las muestras incluyen, en el contexto de la terapia celular, p. ej., terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogénicas.

En muchas realizaciones, la muestra puede derivarse de líquidos en los que al menos se sospecha que están presentes los linfocitos T de interés. En muchas realizaciones, una fuente inicial adecuada para la muestra es la sangre. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de hemoderivado. La muestra de hemoderivado puede derivarse de sangre completa o de una fracción de la misma, por ejemplo, suero, plasma, etc., donde en muchas realizaciones la muestra se deriva de células sanguíneas extraídas de sangre completa. En algunos aspectos, la fuente de muestra contiene células mononucleares. Por ejemplo, una muestra biológica es o contiene células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o se deriva de PBMC.

En algunas realizaciones en las que la muestra es una muestra derivada de PBMC, la muestra es generalmente una muestra líquida derivada de PBMC. Puede emplearse cualquier metodología conveniente para producir una muestra fluida de PBMC. En muchas realizaciones, la muestra líquida derivada de PBMC se prepara separando las PBMC de la sangre completa, es decir, se recogen las PBMC, p. ej., por centrifugación (como por centrifugación en gradiente

de densidad Ficoll-Hypaque, se divulguen protocolos representativos para dichos procedimientos de separación en el documento WO 98/15646 y la patente de EE.UU. n.º 5.985.565).

5 En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tumor y, por lo tanto, proporciona una fuente de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL). En algunos aspectos, Los TIL son linfocitos T que abandonaron el torrente sanguíneo de un sujeto y migraron o se infiltraron en un tumor. En aspectos particulares, Los TIL son reactivos a un antígeno tumoral.

10 Se puede obtener una muestra de tumor de un paciente mediante cualquiera de una variedad de métodos en los que el método obtiene una muestra que contiene una mezcla de células tumorales y TIL. En algunas realizaciones, la muestra del tumor se obtiene mediante resección quirúrgica. En algunas realizaciones, la muestra del tumor se obtiene mediante biopsia con aguja. En general, la muestra del tumor puede ser de cualquier tumor sólido, incluyendo tumores primarios, tumores invasivos o tumores metastásicos. La muestra de tumor también puede ser un tumor líquido, tal como un tumor obtenido de una neoplasia hematológica. El tumor sólido puede ser de cualquier tipo de cáncer, incluyendo, pero sin limitación, mama, pancreático, próstata, colorrectal, pulmón, cerebro, renal, estómago
15 (gastrointestinal) y piel (incluidos, entre otros, carcinoma epidermoide, carcinoma de células basales y melanoma). En realizaciones particulares, el tumor es cualquiera de los descritos en la Sección III. En algunas realizaciones, la muestra de tumor proviene de la misma fuente de tumor que se usó para identificar un neoantígeno para preparar neopeptidos peptídicos.

20 En las realizaciones proporcionadas, la muestra de tumor obtenida se fragmenta en pequeños trozos de entre o aproximadamente 1 mm³ y o aproximadamente 8 mm³ de tamaño, tal como entre o aproximadamente 1 mm³ y o aproximadamente 6 mm³, entre o aproximadamente 1 mm³ y o aproximadamente 4 mm³, entre o aproximadamente 1 mm³ y o aproximadamente 2 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento de tumor mide aproximadamente 2-3 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento de tumor mide aproximadamente 1-2 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento de tumor se obtiene mediante fragmentación física, tal como mediante disección. En algunas realizaciones, el fragmento de tumor se obtiene mediante disección cortante.

30 En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, la muestra de tumor obtenida se fragmenta en pequeños trozos de entre o aproximadamente 1 mm y o aproximadamente 8 mm de diámetro, tal como entre o aproximadamente 1 mm y o aproximadamente 6 mm de diámetro, entre o aproximadamente 1 mm y o aproximadamente 4 mm de diámetro, entre o aproximadamente 1 mm y o aproximadamente 2 mm de diámetro. En algunas realizaciones, el fragmento de tumor tiene aproximadamente 2-3 mm de diámetro. En algunas realizaciones, el fragmento de tumor tiene aproximadamente 1-2 mm de diámetro. En algunas realizaciones, el fragmento de tumor se obtiene mediante fragmentación física, tal como mediante disección. En algunas realizaciones, el fragmento de tumor se obtiene mediante disección cortante.
35

En algunas realizaciones, la muestra del tumor se crioconserva antes de la fragmentación. En algunas realizaciones, los fragmentos de tumor se crioconservan.

40 En algunas realizaciones, los fragmentos de tumor obtenidos se colocan en medios de cultivo en condiciones y con nutrientes apropiados para mediar la activación de los linfocitos T y/o sostener la expansión de los linfocitos T, tal como cualquiera de las condiciones descritas en la Subsección I.B.2 a continuación para la estimulación de linfocitos T. En algunas realizaciones, se colocan de 1 a 500 fragmentos de tumor (por ejemplo, cada uno de 1 a 8 mm de tamaño) en un recipiente de cultivo apropiado en condiciones de expansión. En algunas realizaciones, se cultivan 10,
45 20, 30, 40, 50 o más fragmentos en condiciones de expansión. El recipiente de cultivo puede ser un micropocillo, matraz, tubo, bolsa u otro dispositivo de sistema cerrado. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo es un recipiente cerrado que proporciona una superficie permeable a los gases, tal como un matraz permeable a los gases. Un recipiente de cultivo de ejemplo que proporciona una superficie permeable a los gases incluye placas o matraces G-Rex. En algunas realizaciones, se coloca 1 fragmento de tumor (de aproximadamente 1-8 mm de diámetro) por cada aproximadamente 2 cm² de área de un recipiente de cultivo. El recipiente de cultivo particular se puede elegir en función del número de fragmentos de tumor disponibles y/o del rendimiento deseado de células. La elección del recipiente de cultivo (por ejemplo, G-Rex) se puede elegir escalando linealmente el número de fragmentos sembrados en la superficie del recipiente de cultivo. En algunas realizaciones, la superficie del recipiente de cultivo es de aproximadamente 2 cm² (por ejemplo, placa G-Rex de 24 pocillos) y se coloca aproximadamente 1 fragmento de tumor
50 (aproximadamente 1-8 mm de diámetro) en el recipiente de cultivo. En algunas realizaciones, la superficie de un recipiente de cultivo es de aproximadamente 10 cm² (por ejemplo, G-Rex 10 o G-Rex 10M) y se colocan aproximadamente 5 fragmentos de tumor (cada uno de aproximadamente 1-8 mm de diámetro) en el recipiente de cultivo. En algunas realizaciones, la superficie de un recipiente de cultivo es de aproximadamente 100 cm² (por ejemplo, G-Rex 100 M/100M-CS) y se colocan aproximadamente 50 fragmentos de tumor (cada uno de aproximadamente 1-8 mm de diámetro) en el recipiente de cultivo. En algunas realizaciones, la superficie de un
60 recipiente de cultivo es de aproximadamente 500 cm² (por ejemplo, G-Rex 500 M/500M-CS) y se colocan aproximadamente 250 fragmentos de tumor (cada uno de aproximadamente 1-8 mm de diámetro) en el recipiente de cultivo. En aspectos de los métodos proporcionados, aumentar el tamaño del vaso de cultivo y, por tanto, el número de fragmentos de tumor por recipiente, puede disminuir la variabilidad en comparación con los métodos que implican recipientes de cultivo más pequeños y/o menos fragmentos por recipiente, por ejemplo, agrupando un mayor número de fragmentos para minimizar la variabilidad intertumoral entre fragmentos.
65

En algunas realizaciones, los fragmentos de tumor se colocan en medios de cultivo para estimular las células utilizando cualquiera de las condiciones descritas en la Subsección I.B.2 a continuación. El medio de cultivo es un medio sin suero que contiene citocinas recombinantes, donde la citocina recombinante es o comprende IL-2, y opcionalmente comprende además IL-7, IL-15 y/o IL-21, tales como IL-12 recombinante o IL-7 e IL-15 recombinantes. La concentración de citocina recombinante puede incluir cualquiera de las descritas. El medio de cultivo es un medio sin suero que contiene IL-2 recombinante, tal como de o aproximadamente 300 UI/ml a o aproximadamente 1000 UI/ml, por ejemplo, de o aproximadamente 300 UI/ml. El medio de cultivo es un medio sin suero que contiene IL-2, conteniendo opcionalmente además un anticuerpo anti-CD3 y/o un agente de direccionamiento a CD28 (por ejemplo, anticuerpo anti-CD28) y una o más citocinas recombinantes adicionales.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados implican la obtención de células de los fragmentos de tumor, tal como por digestión enzimática de fragmentos de tumores para obtener TIL. La digestión enzimática se puede realizar utilizando una colagenasa, tal como una colagenasa tipo IV o una colagenasa tipo I/II. La enzima, tal como una colagenasa, puede estar presente en medios para la digestión enzimática en una concentración de o aproximadamente 1 mg/ml a o aproximadamente 5 mg/ml, tal como de o aproximadamente 1 mg/ml, de o aproximadamente 2 mg/ml, de o aproximadamente 3 mg/ml, de o aproximadamente 4 mg/ml o de o aproximadamente 5 mg/ml, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, la digestión enzimática es con un medio que incluye colagenasa tipo IV, tal como de o aproximadamente 1 mg/ml a o aproximadamente 5 mg/ml. En algunas realizaciones, la digestión enzimática es con un medio que incluye colagenasa tipo I/II, tal como de o aproximadamente 1 mg/ml a o aproximadamente 5 mg/ml. En otras realizaciones, se pueden utilizar enzimas del kit de disociación de tumores humanos de Miltenyi (p. ej., Cat. O. 130-095-929; Miltenyi Biotec). Los medios enzimáticos que contienen la enzima pueden ser medios sin suero, tales como cualquiera como se describe. En realizaciones particulares, los medios enzimáticos incluyen colagenasa, p. ej., tampón Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, glutamato 2 mM (p. ej. GlutaMAX), 10 mg/ml de gentamicina, 30 unidades/ml de ADNasa y 1,0 mg/ml de colagenasa). En algunas realizaciones, los medios enzimáticos incluyen un medio sin suero (por ejemplo, OpTmizer) que contiene glutamato 2 mM (por ejemplo, GlutaMAX), 10 µg/ml de gentamicina, un reemplazo de suero de células inmunitarias (por ejemplo, reemplazo de suero de células inmunitarias CTS) y de 1,0 mg/ml a 5,0 mg/ml de colagenasa). En algunas realizaciones, la colagenasa es una colagenasa tipo IV. En algunas realizaciones, la colagenasa es una colagenasa tipo I/II.

A continuación, el fragmento de tumor se disecciona mecánicamente para disociar los TIL, p. ej., utilizando un disociador de tejidos. Un ejemplo de disociador de tejidos es GentleMACs™ (Miltenyi Biotec) para homogeneizar el tejido. Se pueden producir digestiones del tumor 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 CO₂, seguido de ciclos repetidos de disociación mecánica e incubación en las condiciones anteriores hasta que solo estén presentes pequeños trozos de tejido. Al final de este proceso, si la suspensión celular contiene una gran cantidad de glóbulos rojos o células muertas, se puede realizar una separación en gradiente de densidad usando FICOLL para eliminar estas células. En algunos casos, la separación se puede lograr mediante centrifugación, en cuyo caso el sedimento celular se puede resuspender y colar a través de, por ejemplo, un colador de 70 µm para eliminar residuos. Se pueden utilizar métodos alternativos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2012/0244133 A1. Cualquiera de los métodos anteriores se puede utilizar en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento para métodos de obtención de TIL para usar en los métodos proporcionados.

En algunas realizaciones, las células digeridas de los fragmentos de tumor se colocan en medios de cultivo en condiciones y con nutrientes apropiados para mediar la activación de los linfocitos T y/o sostener la expansión de los linfocitos T, tal como cualquiera de las condiciones descritas en la Subsección I.B.2 a continuación para la estimulación de linfocitos T. Las células se siembran a una densidad particular adecuada para el recipiente de cultivo particular. El recipiente de cultivo puede ser un micropocillo, matraz, tubo, bolsa u otro dispositivo de sistema cerrado. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo es un recipiente cerrado que proporciona una superficie permeable a los gases, tal como un matraz permeable a los gases. Un recipiente de cultivo de ejemplo que proporciona una superficie permeable a los gases incluye placas o matraces G-Rex. En algunas realizaciones se siembran de aproximadamente 5×10^5 a 2×10^6 células de una suspensión de células individuales digeridas enzimáticamente por cada aproximadamente 2 cm² de área de un recipiente de cultivo. El recipiente de cultivo particular se puede elegir en función del número de células disponibles y/o del rendimiento de células deseado. La elección del recipiente de cultivo (por ejemplo, G-Rex) se puede elegir escalando linealmente el número de células sembradas en la superficie del recipiente de cultivo. En algunas realizaciones, la superficie del recipiente de cultivo es de aproximadamente 2 cm² (por ejemplo, placa G-Rex de 24 pocillos) y en el recipiente de cultivo se colocan de aproximadamente 5×10^5 a 2×10^6 células de una suspensión de células individuales digeridas enzimáticamente. En algunas realizaciones, la superficie de un recipiente de cultivo es de aproximadamente 10 cm² (por ejemplo, G-Rex 10 o G-Rex 10M) y en el recipiente de cultivo se colocan aproximadamente $2,5 \times 10^6$ a 1×10^7 células de una suspensión de células individuales digeridas enzimáticamente. En algunas realizaciones, la superficie de un recipiente de cultivo es de aproximadamente 100 cm² (por ejemplo, G-Rex 100 M/100M-CS) y en el recipiente de cultivo se colocan aproximadamente $2,5 \times 10^7$ a 1×10^8 células de una suspensión de células individuales digeridas enzimáticamente. En algunas realizaciones, la superficie de un recipiente de cultivo es de aproximadamente 500 cm² (por ejemplo, G-Rex 500 M/500M-CS) y en el

recipiente de cultivo se colocan aproximadamente $1,25 \times 10^8$ a 5×10^8 células de una suspensión de células individuales digeridas enzimáticamente.

5 El medio de cultivo es un medio sin suero que contiene IL-2 recombinante. En algunas realizaciones, también se pueden incluir uno o más agentes estimulantes de linfocitos T adicionales. El medio de cultivo es un medio sin suero que contiene IL-2 recombinante y opcionalmente un anticuerpo anti-CD3 y/o un agente dirigido a CD28 (por ejemplo, anticuerpo anti-CD28) y una o más citocinas recombinantes adicionales (IL-7, IL-15 y/o IL-21).

10 La muestra se puede obtener de una variedad de sujetos/pacientes/hospedadores diferentes. Generalmente dichos hospedadores son "mamíferos" o "de mamíferos", donde estos términos se usan ampliamente para describir organismos que están dentro de la clase mamíferos, incluyendo los órdenes carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas) y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los hospedadores serán seres humanos.

15 En algunos aspectos, el sujeto es un ser humano. En consecuencia, las células en algunas realizaciones son células primarias, p. ej., células humanas primarias. En algunas realizaciones, la muestra es autóloga de un sujeto a tratar, tal como un sujeto que es un paciente que necesita una intervención terapéutica particular, tal como la terapia celular adoptiva para la que se aíslan, procesan y/o expanden células de acuerdo con los métodos proporcionados. En algunas realizaciones, la muestra es alogénica para un sujeto a tratar.

20 En algunas realizaciones, los linfocitos T para usar junto con los métodos proporcionados se pueden enriquecer o clasificar de diversas maneras, incluidas, pero sin limitación, separación de perlas magnéticas, clasificación de células fluorescentes y clasificadores de células desechables basados en cartuchos cerrados. En aspectos particulares, se puede utilizar uno o más reactivos específicos de linfocitos T o un subconjunto de los mismos, tales como reactivos específicos de marcadores de activación de linfocitos T para seleccionar células reactivas, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos fluorescentes, nanopartículas o perlas en equipos de selección celular, pero sin limitación, el ClineMACS, Sony FX500 o los sistemas de clasificación de células Tyto (Miltenyi).

30 En algunos aspectos, Los linfocitos T se pueden seleccionar a partir de una muestra biológica, tal como en función de los marcadores de linfocitos T CD3, CD4 o CD8. En algunas realizaciones, seleccionar un linfocito T que sea positivo en superficie para uno o más marcadores de superficie celular incluye cualquier método de separación basado en dichos marcadores.

35 En algunas realizaciones, la separación es una separación basada en afinidad o inmutafinidad. Por ejemplo, el aislamiento en algunos aspectos incluye la separación de células y poblaciones de células en función de la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, típicamente marcadores de superficie celular, por ejemplo, por incubación con un anticuerpo o un miembro de unión que se une específicamente a dichos marcadores, seguido generalmente por etapas de lavado y separación de las células que se han unido al anticuerpo o al miembro de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o al miembro de unión. En algunas realizaciones, las selecciones basadas en inmutafinidad incluyen poner en contacto una muestra que contiene células, tal como una muestra que contiene una población masiva de linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T humanos primarios, que contiene linfocitos T CD3+ o linfocitos CD4+ y CD8+, con un anticuerpo o miembro de unión que se une específicamente al marcador o marcadores de la superficie celular. En algunas realizaciones, el anticuerpo o miembro de unión está unido a un soporte sólido o matriz, tal como una esfera o perla, por ejemplo, una nanopartícula, microperlas, nanopelotas, incluyendo agarosa, perlas magnéticas o perlas paramagnéticas, para permitir la separación de células para la selección positiva y/o negativa. En algunas realizaciones, las esferas o perlas se pueden empaquetar en una columna para realizar la cromatografía de inmutafinidad, en la cual una muestra que contiene células, tales como linfocitos T humanos primarios, que contiene linfocitos T CD3+ o linfocitos CD4+ y CD8+, se pone en contacto con la matriz de la columna y posteriormente se eluye o se libera de la misma. En otras realizaciones, el anticuerpo o miembro de unión está marcado de manera detectable.

50 En algunos aspectos, la muestra o composición de células a separar se incuba con material pequeño, magnetizable o magnéticamente sensible, tales como partículas o micropartículas magnéticamente sensibles, tales como nanopartículas o perlas paramagnéticas. El material magnéticamente sensible, p. ej., partícula, generalmente está unido directa o indirectamente a un miembro de unión, p. ej., un anticuerpo, que se une específicamente a una molécula, p. ej., un marcador de superficie, presente en la célula, células, o población de células que se desea separar, p. ej., que se desea seleccionar negativa o positivamente. Dichas perlas son conocidas y están comercializadas en una variedad de fuentes que incluyen, en algunos aspectos, Dynabeads® (Life Technologies, Carlsbad, CA), perlas MACS® (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) o reactivos de cuenta Streptamer® (IBA, Alemania). En algunos aspectos, la muestra se coloca en un campo magnético, y aquellas células que tienen partículas magnéticamente sensibles o magnetizables unidas a la misma serán atraídas por el imán y separadas de las células no marcadas. Para una selección positiva, se retienen las células que son atraídas por el imán; para la selección negativa, se retienen las células que no son atraídas (células sin marcar).

65 En determinadas realizaciones, la muestra se pone en contacto con un agente aglutinante, p. ej., un agente aglutinante marcado de forma detectable, que se une específicamente a un marcador de la superficie celular. En determinadas

- realizaciones, el o los agentes aglutinantes marcados de forma detectable están marcados de forma fluorescente. En determinadas realizaciones, los linfocitos T marcados con agentes de unión específicos de un marcador de superficie celular se identifican mediante citometría de flujo. En determinadas realizaciones, el método incluye además separar cualquier linfocito T resultante marcado con el o los agentes de unión de otros componentes de la muestra para producir una composición enriquecida en linfocitos T positivos para uno o más marcadores de superficie celular. Se puede utilizar un equipo de clasificación por selección de células que tenga un rendimiento suficientemente alto para manejar grandes volúmenes y números de células. El equipo de clasificación de células no limitante incluye, por ejemplo, Sony FX500 o los sistemas de clasificación de células Tyto (Miltenyi).
- 5
- 10 La incubación generalmente se lleva a cabo en condiciones en las que los anticuerpos o miembros de unión, o moléculas, tales como anticuerpos secundarios u otros reactivos, que se unen específicamente a dichos anticuerpos o miembros de unión, que están unidos a la partícula o perla magnética y/o están etiquetados de manera detectable, se unen específicamente a las moléculas de la superficie celular si están presentes en las células dentro de la muestra. En algunos aspectos, las células unidas a los anticuerpos se pueden recuperar o separar de las células no unidas en la muestra.
- 15
- En algunos aspectos, se realiza una combinación de selección positiva y negativa durante la misma etapa de selección, en donde las fracciones positivas y negativas se retienen y se procesan adicionalmente o se someten a etapas de separación adicionales. Estas etapas de separación se pueden basar en una selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos se retienen para un uso posterior, y/o selección negativa, en la que se retienen las células que no se han unido al anticuerpo o al miembro de unión. En algunos ejemplos, ambas fracciones se conservan para un uso posterior. En algunos aspectos, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no hay ningún anticuerpo disponible que identifique específicamente un tipo de célula en una población heterogénea, de modo que la separación se lleve a cabo mejor basándose en marcadores expresados por células distintas de la población deseada.
- 20
- 25
- No es necesario que la separación dé como resultado un enriquecimiento del 100 % o la eliminación de una población celular particular o células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento de células de un tipo particular, tales como las que expresan un marcador, se refiere al aumento del número o porcentaje de dichas células, pero no tiene por qué dar como resultado una ausencia completa de células que no expresan el marcador. Igualmente, la selección negativa, la eliminación o el agotamiento de células de un tipo particular, tales como las que expresan un marcador, se refieren a disminuir el número o porcentaje de dichas células, pero no tiene por qué resultar en la eliminación completa de todas esas células. Por ejemplo, en algunos aspectos, una selección de una de la población CD4+ o CD8+ enriquece dicha población, ya sea la población CD4+ o CD8+, pero también puede contener algún porcentaje residual o pequeño de otras células no seleccionadas, que pueden, en algunos casos, incluir al resto de la población CD4 o CD8 que aún esté presente en la población enriquecida.
- 30
- 35
- En algunas realizaciones, el aislamiento se lleva a cabo mediante el enriquecimiento de una población celular particular mediante selección positiva, o el agotamiento de una población celular particular, por selección negativa. En algunas realizaciones, la selección positiva o negativa se logra incubando células con uno o más anticuerpos u otro agente de unión que se une específicamente a uno o más marcadores de superficie expresados o expresados (marcador⁺) a un nivel relativamente más alto (marcador^{alto}) en las células seleccionadas positiva o negativamente, respectivamente.
- 40
- En realizaciones particulares, una población de linfocitos T es aquella que incluye linfocitos T CD4+ y CD8+. Muchos cánceres, incluyendo tumores sólidos, tales como muchas indicaciones epiteliales comunes (por ejemplo, GI), expresan mutaciones restringidas de clase I y clase II. Para que un producto de linfocitos T se dirija a tales indicaciones, por ejemplo, indicaciones epiteliales comunes, se contempla que sean necesarios tanto los linfocitos T CD8+ para reconocer moléculas restringidas al MHC de clase I como los linfocitos T CD4+ para reconocer moléculas restringidas al MHC de clase II.
- 45
- 50
- En algunas realizaciones, los métodos incluyen el aislamiento, selección y/o enriquecimiento de linfocitos CD3+. En algunas realizaciones, los métodos incluyen el aislamiento, selección y/o enriquecimiento de linfocitos CD4+ y CD8+. En algunos aspectos, una etapa de selección de CD4+ o CD8+, tal como la selección positiva para CD4 y la selección positiva para CD8, se utiliza para separar linfocitos CD4+ colaboradores y CD8+ citotóxicos. Dichas selecciones en algunos aspectos se realizan de forma simultánea y en otros aspectos se llevan a cabo de forma secuencial, en cualquier orden. En algunas realizaciones, los métodos incluyen el enriquecimiento de linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante la selección de linfocitos T con expresión de superficie positiva para CD3 o mediante selección secuencial o simultánea de linfocitos T con expresión de superficie positiva para CD4 y linfocitos T con expresión de superficie positiva para CD8. Dichos linfocitos T CD3+, o poblaciones CD4+ y/o CD8+, se pueden clasificar además en subpoblaciones mediante selección positiva o negativa para marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en linfocitos T reactivos a tumores o en linfocitos T que tienen expresión de marcadores de activación de linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores, por ejemplo, como se describe en la Sección I.D.
- 55
- 60
- 65 En algunas realizaciones, los linfocitos T seleccionados pueden enriquecerse aún más en linfocitos T reactivos a tumores basándose en la expresión de un marcador asociado con linfocitos T activados. Marcadores particulares para

usar en la selección o el enriquecimiento de dichos linfocitos T reactivos a tumores se describen en la Sección I.D. a continuación. En otros casos, la selección o el enriquecimiento de linfocitos T reactivos a tumores se lleva a cabo en una o más etapas posteriores del proceso, tal como después del cocultivo con uno o más péptidos mutados (neoepítipo peptídico).

5 En algunas realizaciones, seleccionar los linfocitos T de la muestra biológica incluye además enriquecer o seleccionar linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que expresan uno o más marcadores de activación asociados con linfocitos T reactivos a tumores. Los marcadores de activación de linfocitos T incluyen marcadores de superficie celular
10 cuya expresión está regulada positivamente o es específica de linfocitos T que han sido expuestos a antígeno y activados. Los marcadores de ejemplo se describen en la Sección I.D a continuación.

15 En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, la muestra biológica es una muestra de origen linfático o una muestra de origen tumoral, y en donde: el número de células al inicio del cultivo está entre o aproximadamente 10×10^6 y 100×10^6 células viables totales, 20×10^6 y 100×10^6 células viables totales, o 12×10^6 y 43×10^6 células viables totales; o aproximadamente 10×10^6 células viables totales, o aproximadamente 12×10^6 células viables totales, 20×10^6 células viables totales, 40×10^6 células viables totales, 60×10^6 células viables totales, o 100×10^6 células viables totales, , o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, el porcentaje de linfocitos T reactivos a tumores al inicio del cultivo está entre el o aproximadamente 1 % y el o aproximadamente 90 %, el o aproximadamente 1 % y el o aproximadamente 75 %, el o aproximadamente 1 % y el o aproximadamente 50 %, el o aproximadamente 1 % y el o aproximadamente 25 % o el o aproximadamente 1 % y el o aproximadamente 14 %.

25 En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, la muestra biológica es una muestra de origen linfático o una muestra de origen tumoral, y en donde el número de linfocitos T positivos para el marcador de superficie de activación de linfocitos T al inicio del cultivo está entre o aproximadamente $0,7 \times 10^6$ y o aproximadamente 15×10^6 linfocitos T, 1×10^6 y o aproximadamente 15×10^6 linfocitos T, o y o aproximadamente $0,7 \times 10^6$ y o aproximadamente $5,4 \times 10^6$ linfocitos T; o y o aproximadamente $0,7 \times 10^6$ linfocitos T, 1×10^6 linfocitos T, $5,4 \times 10^6$ linfocitos T, o 15×10^6 linfocitos T, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores.

30 **2. Estimulación de linfocitos T para la expansión inicial**

En aspectos de los métodos proporcionados, los linfocitos T de la muestra biológica (entrada o primera población de linfocitos T, tales como los presentes en un fragmento de tumor resecado) se incuban o cultivan en presencia de uno o más agentes estimuladores de linfocitos T en condiciones para estimular los linfocitos T, tal como expandir los
35 linfocitos T en donde la estimulación se realiza en un sistema cerrado usando medio sin suero, y en donde el uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante. En algunas realizaciones, la incubación o cultivo con uno o más agentes estimuladores de linfocitos T da como resultado la expansión o el crecimiento de linfocitos T seleccionados, o un subconjunto o subtipo deseado de los mismos o de células viables de los mismos, para usar en etapas posteriores de los métodos proporcionados. En el presente documento se describen ejemplos no limitantes del agente o agentes estimuladores de linfocitos T y condiciones para la incubación o cultivo.

40 En algunas realizaciones, el o los agentes estimuladores de linfocitos T incluyen una citocina estimulante de linfocitos T recombinante adicional, tales como IL-7, IL-15 y/o IL-21. La citocina estimulante de los linfocitos T incluye IL-2, opcionalmente sola o en combinación con otra citocina de entre IL-7, IL-15 y/o IL-21. En algunas realizaciones, la citocina estimulante de linfocitos T incluye adicionalmente IL-7 e IL-15.

50 En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T adicional se selecciona entre un agente que inicia la señalización intracelular de TCR/CD3 y un agente que inicia la señalización a través de un receptor coestimulador. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el agente que inicia la señalización intracelular de TCR/CD3 es un anticuerpo anti-CD3, tal como OKT3. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el agente que inicia la señalización a través de un receptor coestimulador comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC), opcionalmente PBMC irradiadas o que no se dividen. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el agente que inicia la señalización a través de un receptor coestimulador es un anticuerpo anti-CD28. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T adicionales es un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, cada uno de los cuales es soluble.

60 Por tanto, entre los métodos proporcionados se encuentran métodos de cultivo de linfocitos T para la fabricación de linfocitos T reactivos a tumores en los que los linfocitos T se cultivan o incuban en presencia de un agente estimulador de linfocitos T en condiciones para expandir los linfocitos T, como los presentes en el cocultivo. En algunas realizaciones, el agente estimulador de linfocitos T incluye un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28.

65 En realizaciones de los métodos proporcionados, las condiciones estimulantes incluyen uno o más agentes, p. ej., ligando, que activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en un linfocito T y/o una señal coestimuladora en un linfocito T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales como los específicos para un componente TCR, p. ej., anti-CD3 y/o receptor coestimulador, por ejemplo, anti-CD28 o anti-4-1BB. En algunas

realizaciones, dichos agentes se añaden al medio de cultivo como anticuerpos solubles. En otras realizaciones, tales agentes están unidos a un soporte sólido tal como una perla. En algunas realizaciones, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T incluye perlas magnéticas conjugadas con anti-CD3/CD28 (p. ej., DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

5 Un anticuerpo anti-CD3 puede incluir cualquier anticuerpo dirigido contra o que pueda unirse específicamente al receptor CD3 en la superficie de los linfocitos T, normalmente CD3 humano en linfocitos T humanos. Los anticuerpos anti-CD3 incluyen OKT3, también conocido como muromonab. Los anticuerpos anti-CD3 también incluyen el clon UHCTI, también conocido como T3 y CD3E. Otros anticuerpos anti-CD3 incluyen, por ejemplo, oteixizumab, 10 teplizumab y visilizumab. El anticuerpo anti-CD3 puede agregarse como reactivo soluble o unido a una perla. En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-CD3 es soluble.

En realizaciones particulares, el o los agentes estimuladores de linfocitos T incluyen un anticuerpo anti-CD3, que se 15 añade al medio de cultivo celular durante la incubación. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 se añade a una concentración que varía entre o aproximadamente 0,1 ng/ml y 50 ng/ml, tal como entre o aproximadamente 0,5 ng/ml y o aproximadamente 50 ng/ml, entre o aproximadamente 0,5 ng/ml y o aproximadamente 30 ng/ml, entre o aproximadamente 0,5 ng/ml y o aproximadamente 15 ng/ml, entre o aproximadamente 0,5 ng/ml y o aproximadamente 5 ng/ml, entre o aproximadamente 0,5 ng/ml y o aproximadamente 1 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o 20 aproximadamente 50 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 30 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 15 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 5 ng/ml, entre o aproximadamente 5 ng/ml y o aproximadamente 50 ng/ml, entre o aproximadamente 5 ng/ml y o aproximadamente 30 ng/ml, entre o aproximadamente 5 ng/ml y o aproximadamente 15 ng/ml, entre o aproximadamente 15 ng/ml y o aproximadamente 30 ng/ml o entre o aproximadamente 30 ng/ml y o aproximadamente 50 ng/ml, cada uno inclusive.

25 En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-CD3 es OKT3. 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 30 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 OKT3. 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 35 ng/ml de anticuerpo OKT3.

En algunas realizaciones, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T incluye la incubación con un anticuerpo anti-CD3 y la incubación con un agente adicional que se une específicamente a CD28 o estimula o induce una señal 40 mediada por CD28 en las células. En algunas realizaciones, la señal mediada por CD28 puede iniciarse o proporcionarse mediante un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, la señal mediada por CD28 puede ser proporcionada por células alimentadoras presentadoras de antígeno (APC), tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

45 En algunas realizaciones, el o los agentes estimuladores de linfocitos T pueden incluir la adición a la población de células alimentadoras de linfocitos T, tales como las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que no se dividen. En algunos aspectos, las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células alimentadoras PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunas realizaciones, las PBMC se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads para evitar la división celular. En algunos aspectos, las células alimentadoras se añaden al medio de cultivo antes de la adición de las poblaciones de linfocitos T. En algunas realizaciones, la 50 población de células resultante contiene al menos aproximadamente 5, 10, 20 o 40 o más células alimentadoras PBMC por cada linfocito T en la población inicial que se va a expandir. En algunas realizaciones, la proporción entre linfocitos T y PBMC y/o células presentadoras de antígeno es de aproximadamente 1 a 25, de aproximadamente 1 a 50, de aproximadamente 1 a 100, de aproximadamente 1 a 125, de aproximadamente 1 a 150, de aproximadamente 1 a 175, de aproximadamente 1 a 200, de aproximadamente 1 a 225, de aproximadamente 1 a 250, de aproximadamente 1 a 275, de aproximadamente 1 a 300, de aproximadamente 1 a 325, de aproximadamente 1 a 350, de aproximadamente 1 a 375, de aproximadamente 1 a 400 o de aproximadamente 1 a 500.

60 En algunas realizaciones, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T pueden incluir la adición a la población de células de un anticuerpo anti-CD28 o de un fragmento de unión al antígeno del mismo. Un anticuerpo anti-CD28 puede incluir cualquier anticuerpo dirigido contra el receptor CD28 en la superficie de los linfocitos T o que pueda unirse específicamente al mismo. Los ejemplos no limitativos de anticuerpos anti-CD28 incluyen NA/LE (por ejemplo, BD Pharmingen), IM1376 (por ejemplo, Beckman Coulter), o 15E8 (por ejemplo, Miltenyi Biotec). El anticuerpo anti-CD28 puede agregarse como reactivo soluble o unido a una perla. En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-CD3 es soluble. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD28 se añade a una concentración que varía entre o 65 aproximadamente 1 ng/ml y 1000 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y 500 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 100 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 10 ng/ml, entre o

aproximadamente 10 ng/ml y o aproximadamente 1000 ng/ml, entre o aproximadamente 10 ng/ml y o aproximadamente 500 ng/ml, entre o aproximadamente 10 ng/ml y o aproximadamente 100 ng/ml, entre o aproximadamente 100 ng/ml y o aproximadamente 1000 ng/ml, entre o aproximadamente 100 ng/ml y o aproximadamente 500 ng/ml o entre o aproximadamente 500 ng/ml y o aproximadamente 1000 ng/ml.

5 El o los agentes estimuladores de linfocitos T incluyen una o más citocinas recombinantes. En algunas realizaciones, la citocina se añade o es exógena al medio de cultivo. Por tanto, en algunas realizaciones, durante el cultivo también se incluyen una o más citocinas recombinantes adicionales. La citocina recombinante incluye IL-2 y opcionalmente una o más de IL-7, IL-15 o IL-21. En algunas realizaciones, el cultivo y la incubación se llevan a cabo en presencia de
10 IL-2 recombinante, IL-15 y IL-7. El cultivo se lleva a cabo en presencia de una IL-2 recombinante. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo en presencia adicional de IL-15 e IL-17. En realizaciones particulares, la citocina o citocinas recombinantes son humanas.

15 La citocina recombinante generalmente es una proteína humana recombinante. En realizaciones particulares, la citocina recombinante está presente en el medio de cultivo celular durante la incubación a una concentración de al menos o al menos aproximadamente 0,5 UI/ml, de al menos o al menos aproximadamente 1,0 UI/ml, de al menos o al menos aproximadamente 5 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 10 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 100 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 1000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 1500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 2000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 2500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 3000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 3500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 4000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 4500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 5000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 5500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 6000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 6500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 7000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de aproximadamente 7500 UI/ml, o de al menos o de al menos o aproximadamente o de aproximadamente 8000 UI/ml. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, y o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, y o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 1000 y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 y o aproximadamente 3000 UI/ml, entre o aproximadamente 3000 y o aproximadamente 4000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 6000 y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 7000 y o aproximadamente 8000 UI/ml, cada uno inclusive.

35 La IL-2 recombinante está presente en el medio de cultivo celular. IL-2 es una citocina que favorece la recuperación y proliferación de linfocitos T. IL-2 también favorece la homeostasis de los linfocitos T, favoreciendo de este modo su fenotipo, estado de diferenciación y memoria inmunitaria. En algunos casos, la inducción de linfocitos T reguladores en el microambiente tumoral puede conducir a una baja biodisponibilidad de IL-2. La IL-2 recombinante se ha utilizado regularmente en una amplia expansión de linfocitos T en diversos contextos. La IL-2 recombinante está
40 comercializada. En realizaciones particulares, la IL-2 recombinante es de calidad GMP (por ejemplo, IL-2 humana recombinante MACS GMP, Miltenyi Biotec).

La IL-2 recombinante se puede incluir en medios de cultivo celular durante diversas etapas del proceso proporcionado. La IL-2 recombinante se incluye en la expansión inicial de los linfocitos T (primera expansión), tales como promover el crecimiento de TIL y permitir su proliferación a partir de tumores sólidos. La IL-2 también puede incluirse en el cocultivo de células presentadoras de antígeno como se describe en la Sección I.C, tal como para permitir la activación máxima de los linfocitos T reactivos al neoantígeno antes de su separación o selección. La IL-2 recombinante también se incluye en cultivos para expandir los linfocitos T reactivos a tumores durante la segunda fase de expansión, tal como se describe en la Sección I.D.

50 En algunas realizaciones, se añade IL-2 recombinante al medio de cultivo a una concentración entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, tal como entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 50 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml o entre o aproximadamente 600 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-2 recombinante está presente en una cantidad que está entre 50 y 400 UI/ml.

En algunas realizaciones, la incubación se realiza con una dosis más alta de IL-2. En algunos aspectos, IL-2 es la única citocina recombinante agregada al cultivo. En algunas realizaciones, la IL-2 recombinante se añade al medio de cultivo en una concentración entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, tal como entre o
 5 aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 4000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, 2000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o
 10 aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 4000 UI/ml, 4000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 UI/ml y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o
 15 aproximadamente 5000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 6000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 6000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml o entre o aproximadamente 7000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-2 recombinante está presente en una cantidad que es o es aproximadamente 6000 UI/ml.

20 En algunas realizaciones, la IL-15 recombinante está presente en el medio de cultivo celular. La IL-15 es una citocina que participa en la homeostasis y activación de los linfocitos T de memoria. En algunos casos, la IL-15 puede promover funciones efectoras de los linfocitos T expuestos a antígenos en ausencia de antígeno y prevenir su diferenciación en un fenotipo agotado. La IL-15 también desempeña un papel en la proliferación de linfocitos T. La IL-15 recombinante está comercializada. En realizaciones particulares, la IL-15 recombinante es de calidad GMP (por ejemplo, IL-15
 25 humana recombinante MACS GMP, Miltenyi Biotec).

La IL-15 recombinante se puede incluir en medios de cultivo celular durante diversas etapas del proceso proporcionado. En algunos casos, la IL-15 recombinante se puede incluir en la expansión inicial de linfocitos T (primera expansión), tal como para promover la expansión de TIL para promover su crecimiento y permitir su proliferación y/o
 30 estabilizar el fenotipo del tumor sólido. La IL-15 recombinante también puede incluirse en el cocultivo de células presentadoras de antígeno como se describe en la Sección I.C, tal como para permitir la activación máxima de los linfocitos T reactivos al neoantígeno antes de su separación o selección. En algunos casos, la IL-15 recombinante también se puede incluir en cultivos para expandir los linfocitos T reactivos a tumores durante la segunda fase de expansión, tal como se describe en la Sección I.D. En algunos casos, la IL-15 recombinante se puede combinar con
 35 la IL-7 recombinante para proporcionar activación, supervivencia y/o expansión de linfocitos T reactivos a tumores en los métodos proporcionados.

En algunas realizaciones, la IL-15 recombinante se añade al medio de cultivo a una concentración entre o aproximadamente 10 UI/ml y 500 UI/ml, tal como entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml,
 40 entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 70 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 50 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 30 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y 500 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o
 45 aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o aproximadamente 70 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o aproximadamente 50 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente
 50 200 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 70 UI/ml, entre o aproximadamente 70 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml, entre o aproximadamente 70 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 70 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 70 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 70 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml, entre o
 55 aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 300 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o
 60 aproximadamente 400 UI/ml, o entre aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-15 se añade al medio de cultivo en una cantidad entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-15 se añade al medio de cultivo a o aproximadamente 180 UI/ml.

65 En algunas realizaciones, se añade IL-7 recombinante al medio de cultivo. IL-7 es una citocina que está implicada en la promoción del mantenimiento y la homeostasis de los linfocitos T. En algunos casos, la IL-7 puede aumentar la

supervivencia y proliferación de los linfocitos T de memoria, particularmente el compartimento central de memoria. La IL-7 recombinante está comercializada. En realizaciones particulares, la IL-7 recombinante es de calidad GMP (por ejemplo, IL-7 humana recombinante MACS GMP, Miltenyi Biotec).

- 5 La IL-7 recombinante se puede incluir en medios de cultivo celular durante diversas etapas del proceso proporcionado. En algunos casos, la IL-7 recombinante se puede incluir en la expansión inicial de linfocitos T (primera expansión), tal como para promover la expansión de TIL para promover su crecimiento y permitir su proliferación y/o estabilizar el fenotipo del tumor sólido. La IL-7 también puede incluirse en el cocultivo de células presentadoras de antígeno como se describe en la Sección I.C, tal como para permitir la activación máxima de los linfocitos T reactivos al neoantígeno
- 10 antes de su separación o selección. En algunos casos, la IL-7 recombinante también se puede incluir en cultivos para expandir los linfocitos T reactivos a tumores durante la segunda fase de expansión, tal como se describe en la Sección I.D. La inclusión de IL-7 recombinante en el proceso puede mantener o apoyar la expansión de subconjuntos de linfocitos T de memoria en el proceso. En algunos casos, la IL-7 recombinante se puede combinar con la IL-15 recombinante para proporcionar activación, supervivencia y/o expansión de linfocitos T reactivos a tumores en los métodos proporcionados. En algunas de dichas realizaciones, la combinación de IL-7 e IL-15 recombinantes es una alternativa al uso de IL-2 recombinante en el cultivo, y los medios de cultivo no contienen adicionalmente IL-2 recombinante.

- 20 En algunas realizaciones, la IL-7 recombinante se añade al medio de cultivo a una concentración entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 800 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 800 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 800 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 600 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 600 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 600 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 800 UI/ml y o aproximadamente 800 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 800 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 800 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 1500 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-7 se añade al medio de cultivo en una cantidad entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-7 se añade al medio de cultivo a o aproximadamente 600 UI/ml.

- 45 En algunas realizaciones, se añade IL-21 recombinante al medio de cultivo. La IL-21 es una citocina que está implicada en una amplia gama de activación de linfocitos T sin aumentar la señalización de los linfocitos T reguladores. En algunos casos, la IL-21 puede apoyar la estabilización de las células de memoria, la función efectora y la proliferación de linfocitos T expuestos a antígenos. La IL-21 puede inducir una regulación positiva de las moléculas efectoras en los linfocitos T CD4 y CD8. La IL-21 recombinante está comercializada. En realizaciones particulares, la IL-21 recombinante es de calidad GMP (por ejemplo, IL-21 humana recombinante MACS GMP, Miltenyi Biotec).

- 50 La IL-21 recombinante se puede incluir en medios de cultivo celular durante diversas etapas del proceso proporcionado. En algunos casos, la IL-21 recombinante se puede incluir en la expansión inicial de linfocitos T (primera expansión), tal como para promover el crecimiento de TIL a partir de tumores sólidos, incluso estabilizando la activación, función y/o proliferación de los linfocitos T de memoria. En algunos aspectos, la presencia de IL-21 permite una recuperación mejorada de los TIL. La IL-21 recombinante también puede incluirse en el cocultivo de células presentadoras de antígeno como se describe en la Sección I.C, tal como debido a la capacidad de estimular la expresión de marcadores de activación de linfocitos T, incluida la expresión de marcadores de activación en TIL reactivos a neoantígenos. En algunos casos, la IL-21 recombinante también se puede incluir en cultivos para expandir los linfocitos T reactivos a tumores durante la segunda fase de expansión como se describe en la Sección I.D, tal como para promover la proliferación y estabilización del fenotipo de memoria.

- 60 En algunas realizaciones, la IL-21 recombinante se añade al medio de cultivo a una concentración entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 20 UI/ml, entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 15 UI/ml, entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 10 UI/ml, entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 5 UI/ml, entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 2,5 UI/ml, entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 1 UI/ml, entre o aproximadamente 1 UI/ml y o aproximadamente 20 UI/ml, entre o aproximadamente 1 UI/ml y o aproximadamente 15 UI/ml, entre o aproximadamente 1 UI/ml y o aproximadamente 10 UI/ml, entre o aproximadamente 1 UI/ml y o aproximadamente 5 UI/ml, entre o aproximadamente

1 UI/ml y o aproximadamente 2,5 UI/ml, entre o aproximadamente 2,5 UI/ml y o aproximadamente 20 UI/ml, entre o aproximadamente 2,5 UI/ml y o aproximadamente 15 UI/ml, entre o aproximadamente 2,5 UI/ml y o aproximadamente 10 UI/ml, entre o aproximadamente 2,5 UI/ml y o aproximadamente 5 UI/ml, entre o aproximadamente 5 UI/ml y o aproximadamente 20 UI/ml, entre o aproximadamente 5 UI/ml y o aproximadamente 15 UI/ml, entre o aproximadamente 5 UI/ml y o aproximadamente 10 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 15 UI/ml, o entre aproximadamente 15 UI/ml y o aproximadamente 20 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-21 se añade al medio de cultivo en una cantidad entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 2,5 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-21 se añade al medio de cultivo a o aproximadamente 1 UI/ml.

El o los agentes estimuladores de linfocitos T presentes durante la incubación, tal como para la expansión de las células, contienen IL-2 recombinante. En algunas realizaciones, se pueden incluir uno o más agentes estimulantes diferentes, tales como una o más citocinas recombinantes diferentes de IL-7, IL-15, IL-21 o un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT-3). En algunos casos en los que se utiliza un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT-3), el o los agentes estimulantes de linfocitos T también pueden incluir un agente coestimulante, tal como el proporcionado por las células alimentadoras presentadoras de antígeno, tales como PBMC o un anticuerpo anti-CD28 soluble.

En realizaciones particulares, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T presentes durante la incubación, tales como para la expansión de las células contienen IL-2 recombinante, un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno, tales como PBMC.

En realizaciones particulares, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T presentes durante la incubación, tales como para la expansión de las células contienen IL-2 recombinante, un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, OKT-3 y un anticuerpo anti-CD28. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 y/o el anticuerpo anti-CD28 son solubles. En algunas realizaciones, uno o ambos del anticuerpo anti-CD3 y del anticuerpo anti-CD28 están unidos a una superficie sólida, tal como una perla (por ejemplo, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

En realizaciones particulares, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T presentes durante la incubación, tales como para la expansión de las células contienen IL-2 recombinante, IL-15 recombinante, IL-7 recombinante, un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno, tales como PBMC.

En realizaciones particulares, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T presentes durante la incubación, tales como para la expansión de las células contienen IL-2 recombinante, IL-15 recombinante, IL-7 recombinante, un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, OKT-3 y un anticuerpo anti-CD28. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 y/o el anticuerpo anti-CD28 son solubles. En algunas realizaciones, uno o ambos del anticuerpo anti-CD3 y del anticuerpo anti-CD28 están unidos a una superficie sólida, tal como una perla (por ejemplo, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

En realizaciones particulares, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T presentes durante la incubación, tales como para la expansión de las células contienen IL-15 recombinante e IL-7 recombinante, un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno, tales como PBMC.

En algunas realizaciones, la incubación con el agente estimulador de linfocitos T se lleva a cabo en condiciones para la expansión inicial de los linfocitos T de la muestra biológica. En algunas realizaciones, las células se cultivan a aproximadamente 37 °C con aproximadamente 5 % de CO₂.

En algunas realizaciones, la incubación con el o los agentes estimuladores de linfocitos T se lleva a cabo durante o aproximadamente 1 día, tal como generalmente durante o aproximadamente 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, o cualquier intervalo de tiempo entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, la incubación con el o los agentes estimuladores de linfocitos T se lleva a cabo durante 7 a 21 días, tal como 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días o 21 días, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante 7-14 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante 7-10 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 7 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 8 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 9 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 10 días.

La incubación, tal como para la expansión inicial de linfocitos T en la muestra biológica, puede llevarse a cabo en condiciones GMP. La incubación se realiza en un sistema cerrado, que en algunos aspectos puede ser un sistema automatizado cerrado. El medio de cultivo que contiene el agente estimulador de linfocitos T es un medio sin suero. En algunas realizaciones, la incubación se realiza en un sistema automatizado cerrado y con medios sin suero.

En algunas realizaciones, la expansión inicial de las células en una o más condiciones estimuladoras se realiza en un recipiente de cultivo adecuado para la expansión celular. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo es un recipiente de cultivo permeable a los gases, tal como un sistema G-Rex (por ejemplo, G-Rex 10, G-Rex 10M, G-Rex

100 M/100M-CS o G-Rex 500 M/500M-CS). En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo es una microplaca, matraz, barra u otro recipiente de cultivo adecuado para la expansión de células en un sistema cerrado. En algunas realizaciones, la expansión se puede llevar a cabo en un biorreactor. En algunas realizaciones, la expansión inicial se puede llevar a cabo utilizando un sistema de expansión de células mediante transferencia de las células a bolsas permeables a los gases, tal como en relación con un biorreactor (por ejemplo, Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare)). En una realización, el sistema de expansión celular incluye un recipiente de cultivo, tal como una bolsa, por ejemplo, bolso de células permeables a los gases, con un volumen que es de aproximadamente 50 ml, 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, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, el proceso es automatizado o semiautomatizado. Ejemplos de biorreactores adecuados para la expansión de perfusión automatizada incluyen, pero no se limitan a, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems y Pall XRS Bioreactor Systems o Miltenyi Prodigy. En algunos aspectos, el cultivo de expansión se lleva a cabo en condiciones estáticas. En algunas realizaciones, el cultivo de expansión se lleva a cabo en condiciones de balanceo. El medio se puede añadir en bolo o se puede añadir según un programa de perfusión. En algunas realizaciones, el biorreactor mantiene la temperatura en o cerca de 37 °C y niveles de CO₂ en o cerca del 5 % con un flujo de aire constante de, aproximadamente, o al menos, 0,01 l/min, 0,05 l/min, 0,1 l/min, 0,2 l/min, 0,3 l/min, 0,4 l/min, 0,5 l/min, 1,0 l/min, 1,5 l/min, o 2,0 l/min o más de 2,0 l/min. En determinadas realizaciones, al menos una parte del cultivo se realiza con perfusión, tal como por ejemplo con una tasa de 290 ml/día, 580 ml/día y/o 1160 ml/día.

En algunas realizaciones, las células se siembran en un recipiente de cultivo apropiado (por ejemplo, una bolsa permeable a los gases) a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/ml a $1,5 \times 10^6$ células/ml. En algunas realizaciones, la densidad es de o aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/ml, $0,75 \times 10^6$ células/ml, 1×10^6 células/ml, $1,25 \times 10^6$ células/ml o $1,5 \times 10^6$ células/ml, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores.

En algunos aspectos, las células se expanden en un sistema de expansión cerrado automatizado que está habilitado para perfusión. Las perfusiones pueden agregar continuamente medios a las células para garantizar que se logre una tasa de crecimiento óptima.

Los métodos de expansión se pueden llevar a cabo en condiciones GMP. La expansión se realiza en un sistema automatizado cerrado y utilizando medio sin suero. En algunas realizaciones, una o más de las etapas del método se pueden llevar a cabo en un sistema cerrado o en condiciones GMP. En determinadas realizaciones, todas las operaciones del proceso se realizan en un entorno GMP. En algunas realizaciones, se utiliza un sistema cerrado para llevar a cabo una o más de las otras etapas de procesamiento de un método para fabricar, generar o producir una terapia celular. En algunas realizaciones, una o más o todas las etapas del procesamiento, p. ej., etapas de aislamiento, selección y/o enriquecimiento, procesamiento, cultivo que incluyen la incubación en relación con la expansión de las células, y las etapas de formulación se llevan a cabo usando un sistema, dispositivo o aparato en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunos aspectos, el sistema o aparato incluye un ordenador y/o un programa informático en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado de y/o ajustar diversos aspectos de las etapas de procesamiento, aislamiento, ingeniería y formulación.

En algunas realizaciones, inmediatamente después de la incubación, las células estimuladas se pueden recoger para un cocultivo posterior con APC, tal como de acuerdo con los métodos descritos en la Sección I.C a continuación.

En algunas realizaciones, las células estimuladas se recogen y se criocongelan. La provisión de una etapa de retención intermedia mediante crioconservación después de la fase de expansión inicial se puede utilizar para coordinar el tiempo con la identificación del neoepítipo y la generación de péptidos, tal como se describe en la Sección I.A y/o la generación de APC como se describe en la Sección I.C. En algunas realizaciones, para la crioconservación, las células estimuladas se formulan como una composición con un crioprotector. En algunas realizaciones, el crioprotector es o comprende DMSO y/o es glicerol. En algunas realizaciones, las composiciones formuladas para la crioconservación se pueden almacenar a bajas temperaturas, tal como temperaturas ultrabajas, por ejemplo, almacenamiento con temperaturas que varían de -40 °C a -150 °C, tal como o aproximadamente $80 \text{ °C} \pm 6,0 \text{ °C}$.

En algunas realizaciones, las células crioconservadas se preparan para las etapas posteriores mediante descongelación. En algunos casos, las células pueden estar listas para un cultivo posterior con APC y péptidos inmediatamente después de descongelarlas después de una o más etapas de lavado.

C. Cocultivo de linfocitos T con APC

En realizaciones de los métodos proporcionados, una vez que se sintetizan los neoepítipos que codifican proteínas, una pluralidad de péptidos sintéticos se ponen en contacto con células presentadoras de antígeno en condiciones para presentar uno o más péptidos no nativos en el contexto de una molécula de MHC y se incuban con la segunda

población de linfocitos T de una población de linfocitos T para el reconocimiento de los péptidos presentados en las APC, en un sistema cerrado utilizando medio sin suero, dichos uno o más péptidos no nativos son péptidos correspondientes a mutaciones somáticas no sinónimas asociadas en el tumor del sujeto, para producir una tercera población de células que contiene linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T endógenos reactivos a la mutación que codifica péptidos del tumor. En algunas realizaciones, los péptidos sintéticos se pulsan en APC autólogas o alogénicas que luego se cocultivan con linfocitos T del paciente. Para presentar estos péptidos se utilizan células presentadoras de antígeno. A continuación se pueden aislar los linfocitos T que reconocen estos péptidos en la superficie de la APC, tal como mediante los métodos descritos a continuación. Las células incubadas se pueden cultivar en condiciones que enriquecen y expanden los linfocitos T reactivos a tumores, es decir, linfocitos T que contienen TCR endógenos que son reactivos con los péptidos presentes en las APC, en el cultivo. En algunas realizaciones, los métodos incluyen cultivar los linfocitos T en condiciones de expansión hasta que se obtenga una cantidad umbral de linfocitos T y/o hasta 20 días después del inicio de la incubación. En algunas realizaciones, de los métodos proporcionados, el método puede incluir cocultivar los linfocitos T con las APC a lo largo de varias horas a días y luego separar las células presentadoras de antígeno de la población de linfocitos T para la expansión de los linfocitos T en condiciones para enriquecer o expandir linfocitos T reactivos a tumores. En algunas realizaciones, de los métodos proporcionados, el método puede incluir cocultivar los linfocitos T con las APC a lo largo de 1 a 7 días, y luego separar las células presentadoras de antígeno de la población de linfocitos T para la expansión de los linfocitos T en condiciones para enriquecer o expandir los linfocitos T reactivos a tumores. En algunas realizaciones, la separación puede incluir aislar o seleccionar linfocitos T reactivos del cultivo basándose en uno o más marcadores de activación de linfocitos T en linfocitos T.

Se pueden utilizar varios métodos para cultivar células para determinar la especificidad del antígeno, véase, por ejemplo, la solicitud publicada de EE. UU. N.º US2017/0224800.

En algunas realizaciones, los linfocitos T reactivos a tumores se cocultivan con APC que han estado en contacto o expuestas para presentar un péptido, por ejemplo, que contiene una secuencia de aminoácidos mutada, tales como péptidos neoepítopos como se ha descrito anteriormente. El método puede comprender inducir células presentadoras de antígeno (APC) autólogas del paciente para que presenten la secuencia de aminoácidos mutada. Las APC pueden incluir cualquier célula que presente fragmentos peptídicos de proteínas junto con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en su superficie celular. La molécula de MHC puede ser cualquier molécula de MHC expresada por el paciente incluyendo, pero sin limitación, moléculas MHC de clase I, MHC de clase II, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Las APC pueden incluir, por ejemplo, una cualquiera o más de macrófagos, DC, células de Langerhans, linfocitos B y linfocitos T. En realizaciones particulares, las APC son DC. En algunas realizaciones particulares, las APC son linfocitos B. En algunas realizaciones, las APC son APC artificiales.

En realizaciones particulares, las APC incluyen células que son capaces de presentar moléculas restringidas de Clase I y Clase II. Por ejemplo, tanto los linfocitos B como las DC tienen la capacidad de presentar moléculas restringidas al MHC de clase I y al MHC de clase II. En algunas realizaciones, la muestra de células APC incluye linfocitos B y DC. En algunas realizaciones, la muestra de células APC está enriquecida con linfocitos B, tal como mediante selección o aislamiento de una muestra de células primarias. En algunas realizaciones, la muestra de células APC está enriquecida para DC, tal como mediante selección o aislamiento de una muestra de células primarias.

En algunas realizaciones, las APC expresan moléculas MHC de clase I y/o MHC de clase II con un HLA coincidente del que se ha obtenido la fuente de linfocitos T. En realizaciones particulares, tanto las APC como los linfocitos T han sido aislados del mismo sujeto, es decir, son autólogos del paciente con cáncer. En algunas realizaciones, el método puede comprender inducir células presentadoras de antígeno (APC) autólogas del paciente para que presenten la secuencia de aminoácidos mutada. Al utilizar APC autólogas del paciente, los métodos pueden identificar linfocitos T que tienen especificidad antigénica por una secuencia de aminoácidos mutada codificada por una mutación específica del cáncer que se presenta en el contexto de una molécula de MHC expresada por el paciente.

En algunas realizaciones, las APC son células de una muestra de sangre o de aféresis de un sujeto, tal como del paciente. En algunas realizaciones, las APC incluyen células presentes en una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Habitualmente, la función de las APC en un cultivo de PBMC implica principalmente monocitos y linfocitos B. En algunas realizaciones, se puede utilizar una población de PBMC aisladas como APC en los métodos proporcionados. Las PBMC se pueden obtener utilizando métodos estándar como la separación en gradiente de Ficoll-Paque. En algunos casos, las APC son o incluyen linfocitos B que se aíslan de la muestra de sangre o de aféresis o de una muestra de PBMC. En otros casos, las APC son o incluyen monocitos aislados de la muestra de sangre o de aféresis o de una muestra de PBMC. En algunos aspectos, los monocitos se pueden usar como fuente para preparar DC derivadas de monocitos para usar como APC. En algunas realizaciones, se puede generar una fuente de DC derivadas de monocitos (por ejemplo, células CD11c^{alto}MHCII^{alto}CD14^{bajo}) *ex vivo* a partir de monocitos aislados, mediante cultivo con GM-CSF e IL-4 durante 4 a 6 días para producir células dendríticas derivadas de monocitos. En realizaciones particulares, los monocitos se aíslan de PBMC, tal como mediante selección de CD14, y luego se cultivan con GM-CSF e IL-4 durante 4 a 6 días.

En algunas realizaciones, las APC son células primarias (por ejemplo, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) que son competentes para replicarse, por ejemplo, las células no se someten a irradiación, tratamiento térmico u otro

método que resulte en su inactivación. En realizaciones particulares, los métodos proporcionados no utilizan APC irradiadas. En algunas realizaciones, las APC son células primarias recién aisladas obtenidas del sujeto, o derivan de células primarias obtenidas del sujeto. En algunas realizaciones, las APC se han criopreservado y posteriormente descongelado antes del cocultivo con los linfocitos T estimulados de acuerdo con los métodos proporcionados.

5 En algunas realizaciones particulares, los linfocitos B se utilizan como fuente de APC y se generan a partir de la aféresis del paciente, tal como una aféresis autóloga del sujeto del que se obtuvieron los fragmentos de tumor y/o los linfocitos T. En otras realizaciones particulares, las células dendríticas derivadas de monocitos se utilizan como fuente de APC y se generan a partir de monocitos a partir de la aféresis de un paciente, tal como una aféresis autóloga del
10 sujeto a partir del cual se obtienen el fragmento de tumor y/o los linfocitos T.

En algunas realizaciones, las APC aisladas o generadas se recogen y se criopreservan. La provisión de una etapa de retención intermedia mediante criopreservación después del aislamiento o generación de APC se puede utilizar para
15 coordinar el tiempo con la identificación del neoepítipo y la generación de péptidos tal como se describe en la Sección I.A y/o la expansión inicial de los linfocitos T, tal como se describe en la Sección I.B. En algunas realizaciones, para la criopreservación, las APC aisladas o generadas se formulan como una composición con un crioprotector. En algunas realizaciones, el crioprotector es o comprende DMSO y/o glicerol. En algunas realizaciones, las composiciones formuladas para la criopreservación se pueden almacenar a bajas temperaturas, tal como temperaturas ultrabajas, por ejemplo, almacenamiento con temperaturas que varían de -40 °C a -150 °C, tal como o aproximadamente 80 °C
20 ± 6,0 °C.

En algunas realizaciones, las células criopreservadas se preparan para las etapas posteriores mediante descongelación. En algunos casos, las células pueden estar listas para el cultivo posterior con linfocitos T y péptidos inmediatamente después de la descongelación después de una o más etapas de lavado.

25 En realizaciones particulares, los métodos para enriquecer o seleccionar células reactivas a tumores se inician poniendo en contacto las PBMC con la secuencia de aminoácidos mutada, tal como uno o más, tal como una pluralidad de, péptidos neoepítipos. Las PBMC/péptidos pueden entonces cultivarse con linfocitos T estimulados. Las PBMC y los linfocitos T se pueden obtener del mismo sujeto.

30 En realizaciones particulares, los métodos para enriquecer o seleccionar células reactivas a tumores se inician poniendo en contacto linfocitos B con la secuencia de aminoácidos mutada, tal como uno o más, tal como una pluralidad de, péptidos neoepítipos. Los linfocitos B/péptidos pueden entonces cultivarse con linfocitos T estimulados. Los linfocitos B y los linfocitos T se pueden obtener del mismo sujeto.

35 En realizaciones particulares, los métodos para enriquecer o seleccionar células reactivas a tumores se inician poniendo en contacto las DC derivadas de monocitos con la secuencia de aminoácidos mutada, tal como uno o más, tal como una pluralidad de, péptidos neoepítipos. Las DC derivadas de monocitos/péptidos pueden luego cultivarse con linfocitos T estimulados. Las DC derivadas de monocitos y los linfocitos T pueden obtenerse o derivarse del mismo
40 sujeto.

En algunas realizaciones, la APC es una célula presentadora de antígeno artificial (aAPC). Habitualmente, las aAPC incluyen características de las APC naturales, incluyendo la expresión de una molécula MHC, molécula o moléculas
45 estimuladoras y coestimuladoras, receptor Fc, molécula o moléculas de adhesión y/o la capacidad de producir o secretar citocinas (por ejemplo, IL-2). Normalmente, una aAPC es una línea celular que carece de expresión de uno o más de los anteriores y se genera mediante la introducción (por ejemplo, mediante transfección o transducción) de uno o más de los elementos que faltan de una molécula de MHC, un receptor Fc de baja afinidad (CD32), un receptor Fc de alta afinidad (CD64), una o más de una señal coestimuladora (por ejemplo, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ICOS-L, ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, ILT3, ILT4, 3/TR6 o un ligando de B7-H3; o un anticuerpo que se une específicamente a CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, receptor de ligando Toll o un ligando de CD83), una molécula de adhesión celular (por ejemplo, ICAM-1 o LFA-3) y/o una citocina (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, interferón alfa (IFN α), interferón beta (IFN β), interferón gamma (IFN γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de necrosis tumoral beta (TNF β), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos (GCSF). En algunos casos, una aAPC normalmente no expresa una molécula de MHC, pero puede diseñarse para expresar una molécula de MHC o, en algunos casos, es o puede ser inducida a expresar una molécula de MHC, tal como por estimulación con citocinas. En algunos casos, las aAPC también se pueden cargar con un ligando estimulador o coestimulador, que puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 o un anticuerpo anti-CD2. Un ejemplo de una línea celular que puede usarse como esqueleto para generar una aAPC es una línea celular K562 o una línea celular de fibroblastos. Se conocen varias aAPC en la técnica, véase, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 8.722.400, la solicitud publicada N.º US2014/0212446; Butler and Hirano (2014) *Immunol Rev.*, 257(1): 10. 1111/imr. 12129; Suhoshki *et al.* (2007) *Mol. Ther.*, 15:981-988). En realizaciones particulares, los métodos para enriquecer o seleccionar células reactivas a tumores se inician poniendo en contacto las aAPC con la secuencia de aminoácidos mutada, tal como uno
60 o más, tal como una pluralidad de, péptidos neoepítipos. A continuación, las aAPC/péptidos pueden cultivarse con linfocitos T estimulados.

La inducción de APC (por ejemplo, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) para que presenten la secuencia de aminoácidos mutada se puede llevar a cabo usando diversos métodos adecuados. En una realización, inducir que las APC presenten la secuencia de aminoácidos mutada (por ejemplo, neoepítipo peptídico) comprende pulsar las APC con péptidos sintéticos que comprenden la secuencia de aminoácidos mutada o un grupo de péptidos, comprendiendo cada péptido del conjunto una secuencia de aminoácidos mutada diferente. En algunos casos, las APC se pulsan con los péptidos mediante electroporación en una célula presentadora de antígeno. Los péptidos sintéticos pueden ser presentados por las células presentadoras de antígeno para que sean reconocidos por los linfocitos CD8 (MHC clase I) o linfocitos CD4 (MHC clase II). En determinadas realizaciones particulares, los péptidos sintéticos se generan para que sean adecuados para la expresión mediante moléculas restringidas al MHC de clase I para su reconocimiento por linfocitos CD8. En otras realizaciones particulares, se generan péptidos sintéticos para que sean adecuados para la expresión mediante moléculas restringidas al MHC de clase II para su reconocimiento por linfocitos CD4.

En algunas realizaciones, las APC (por ejemplo, PBMC, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) se ponen en contacto con un único péptido o un grupo de péptidos. El grupo de péptidos puede representar muchas secuencias de aminoácidos mutadas diferentes, tales como 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 100 péptidos, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores.

Los péptidos o grupo de péptidos se cargan en células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas), tal como por pulsación de péptidos, en concentraciones adecuadas para su presentación en la superficie de un complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

En algunas realizaciones, la concentración de péptido que representa un péptido individual o único puede variar entre o aproximadamente 0,00000 1 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de péptido que representa un péptido individual o único puede variar entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,001 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,0001 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,001 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,001 µg/ml, entre o aproximadamente 0,001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml, entre o aproximadamente 0,01 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,1 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,1 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración que representa un péptido individual o único puede ser de o aproximadamente 0,00000 1 µg/ml, de o aproximadamente 0,00001 µg/ml, de o aproximadamente 0,0001 µg/ml, de o aproximadamente 0,001 µg/ml, de o aproximadamente 0,01 µg/ml, de o aproximadamente 0,1 µg/ml, de o aproximadamente 1 µg/ml, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, los péptidos son un grupo de péptidos que representan muchas secuencias de aminoácidos mutadas diferentes y la concentración en promedio de péptidos individuales o únicos en el grupo puede variar entre o aproximadamente 0,00000 1 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml. En algunas realizaciones, los péptidos son un grupo de péptidos que representan muchas secuencias de aminoácidos mutadas diferentes y la concentración en promedio de péptidos individuales o únicos en el grupo puede variar entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,0001 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,001 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,001 µg/ml y 10 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,001 µg/ml, entre o aproximadamente 0,001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml, entre o aproximadamente 0,01 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,1 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,1 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml, entre o aproximadamente 0,1 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, o entre o aproximadamente 1 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración promedio de péptidos individuales o únicos en el grupo puede ser de o aproximadamente 0,00000 1 µg/ml, de o aproximadamente 0,00001 µg/ml, de o aproximadamente 0,0001 µg/ml, de o aproximadamente 0,001 µg/ml, de o aproximadamente 0,01 µg/ml, de o aproximadamente 0,1 µg/ml, de o aproximadamente 1 µg/ml, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores.

nucleótidos en las APC se puede llevar a cabo de diversas formas diferentes. Ejemplos no limitativos de técnicas que son útiles para introducir una secuencia de nucleótidos en las APC incluyen transformación, transducción, transfección y electroporación. En algunos casos, los péptidos para unión a moléculas restringidas al MHC de clase II se presentan como un gen que codifica el ADN de la mutación y se electroporan en la célula presentadora de antígeno. Este ADN luego se transcribirá in vitro en ARN que codifica péptidos en la superficie para su reconocimiento por linfocitos CD4+.

En algunos casos, se pueden emplear métodos Tandem Mini Gene para hacer esto para moléculas restringidas al MHC de clase II, véase, por ejemplo, la solicitud de patente PCT publicada número WO2016/053338 y Parkhurst *et al.* (2016) Clin Cancer Res., 23:2491-505. En una realización en la que se identifica más de un gen, el método puede comprender preparar más de una secuencia de nucleótidos, donde cada una codifica una secuencia de aminoácidos mutada codificada por un gen diferente e introduce cada secuencia de nucleótidos en una población diferente de APC. A este respecto, se pueden obtener múltiples poblaciones de APC, expresando y presentando cada población una secuencia de aminoácidos mutada diferente. Por ejemplo, en el caso de que se utilicen minigenes en tándem, las APC (por ejemplo, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) se electroporan con una mezcla de ADN (pluralidad de ADN) que codifica secuencias de aminoácidos mutadas diferentes, que luego se transcribirán in vitro en ARN que codifica péptidos para el reconocimiento de superficie por parte de los linfocitos T CD4+.

En algunas realizaciones, las APC (por ejemplo, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) se electroporan utilizando el sistema de electroporación continua Lonza 4D Nucleofector.

Los métodos incluyen agregar linfocitos T (por ejemplo, de un paciente que tiene un tumor) con el cultivo de APC que presentan los péptidos y cocultivar las APC y los linfocitos T durante un período de tiempo para permitir la presentación y el reconocimiento del péptido en la superficie de las APC por uno o más linfocitos T de la población. En las realizaciones proporcionadas, los linfocitos T incluyen una población de linfocitos T estimulados.

En algunas realizaciones, para la pulsación de péptidos, las APC (por ejemplo, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) se incuban con péptidos durante entre o aproximadamente 2 horas y o aproximadamente 48 horas, tal como entre o aproximadamente 2 horas y o aproximadamente 36 horas, entre o aproximadamente 2 horas y o aproximadamente 24 horas, entre o aproximadamente 2 horas y o aproximadamente 24 horas, entre o aproximadamente 2 horas y o aproximadamente 18 horas, entre o aproximadamente 2 horas y o aproximadamente 12 horas, entre o aproximadamente 2 horas y o aproximadamente 6 horas, entre o aproximadamente 6 horas y o aproximadamente 48 horas, entre o aproximadamente 6 horas y o aproximadamente 36 horas, entre o aproximadamente 6 horas y o aproximadamente 24 horas, entre o aproximadamente 6 horas y o aproximadamente 24 horas, entre o aproximadamente 6 horas y o aproximadamente 18 horas, entre o aproximadamente 6 horas y o aproximadamente 12 horas, entre o aproximadamente 12 horas y o aproximadamente 48 horas, entre o aproximadamente 12 horas y o aproximadamente 36 horas, entre o aproximadamente 12 horas y o aproximadamente 24 horas, entre o aproximadamente 12 horas y o aproximadamente 18 horas, entre o aproximadamente 18 horas y o aproximadamente 18 horas y o aproximadamente 18 horas y o aproximadamente 36 horas, entre o aproximadamente 18 horas y o aproximadamente 36 horas, entre o aproximadamente 18 horas y o aproximadamente 24 horas, entre o aproximadamente 24 horas y o aproximadamente 48 horas, entre o aproximadamente 24 horas y o aproximadamente 36 horas, o entre o aproximadamente 36 horas y o aproximadamente 48 horas. En algunas realizaciones, las APC (por ejemplo, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) se incuban con péptidos durante o aproximadamente 4 horas, durante o aproximadamente 6 horas, durante o aproximadamente 7 horas, durante o aproximadamente 8 horas, durante o aproximadamente 9 horas, durante o aproximadamente 10 horas, durante o aproximadamente 12 horas, durante o aproximadamente 14 horas, durante o aproximadamente 16 horas, durante o aproximadamente 18 horas, durante o aproximadamente 20 horas, durante o aproximadamente 22 horas, durante o aproximadamente 24 horas, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores.

En realizaciones particulares, las APC (por ejemplo, PBMC, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) se incuban con péptidos durante la noche, tal como entre o aproximadamente 8 y 12 horas. En algunas realizaciones, la incubación del cocultivo dura aproximadamente 6 horas.

Los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T estimulados) y las APC (por ejemplo, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) pueden estar presentes en un cultivo en una proporción entre linfocitos T y APC de 1:100 a 100:1, tal como de 1:50 a 50:1, de 1:25 a 25:1, de 1:10 a 10:1 o de 1:5 a 5:1. En algunas realizaciones, la proporción entre linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T estimulados) y APC es de o aproximadamente 1:100, de o aproximadamente 1:50, de o aproximadamente 1:25, de o aproximadamente 1:10, de o aproximadamente 1:5, de o aproximadamente 1:2,5, de o aproximadamente 1:1, de o aproximadamente 2:5:1, de o aproximadamente 5:1, de o aproximadamente 10:1, de o aproximadamente 25:1, de o aproximadamente 50:1 o de o aproximadamente 100:1, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, la proporción entre linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T estimulados) y APC está entre 20:1 y 1:1, entre 15:1 y 1:1, entre 10:1 y 1:1, entre 5:1 y 1:1, o entre 2,5:1 y 1:1. En algunas realizaciones, la proporción entre linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T estimulados) y APC está entre 1:20 y 1:1, entre 1:15 y 1:1, entre 1:10 y 1:1, entre 1:5 y 1:1, o entre 1:2,5 y 1:1. En realizaciones particulares, el cocultivo se realizará mezclando los linfocitos T, por ejemplo, la población de linfocitos T estimulados y APC (por ejemplo, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) en una proporción de aproximadamente 3:1. En algunas realizaciones, el cocultivo se realizará mezclando los linfocitos T, por ejemplo, la población de linfocitos T estimulados y APC (por ejemplo, linfocitos B o DC derivadas de monocitos) en una proporción de aproximadamente 1:1.

En algunas realizaciones, se añaden al cocultivo una o más citocinas recombinantes para mantener los linfocitos T. En algunas realizaciones, la citocina recombinante puede incluir una o más de IL-2, IL-7, IL-15 o IL-21. En algunas

realizaciones, el cocultivo se lleva a cabo en presencia de IL-2 recombinante, IL-15 y IL-7. En algunas realizaciones, el cocultivo se lleva a cabo en presencia de una IL-2. En algunas realizaciones, el cocultivo se lleva a cabo en presencia de IL-15 e IL-17, lo que, en algunos aspectos no incluye adicionalmente IL-2.

5 La citocina recombinante generalmente es una proteína humana recombinante. En realizaciones particulares, la citocina recombinante está presente en el medio de cultivo celular durante el cocultivo a una concentración de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 10 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 100 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 1000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 1500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 2000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 2500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 3000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 3500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 4000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 4500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 5000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 5500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 6000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 6500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 7000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 7500 UI/ml, o de al menos o de al menos o aproximadamente o de aproximadamente 8000 UI/ml. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, y o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, y o aproximadamente 1000 y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 y o aproximadamente 3000 UI/ml, entre o aproximadamente 3000 y o aproximadamente 4000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 6000 y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 7000 y o aproximadamente 8000 UI/ml, cada uno inclusive.

25 En algunas realizaciones, la IL-2 recombinante está presente en el medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, se añade IL-2 recombinante al medio de cultivo a una concentración entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, tal como entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 50 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml o entre o aproximadamente 600 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-2 recombinante está presente en una cantidad que está entre 50 y 400 UI/ml.

En algunas realizaciones, la incubación se realiza con una dosis más alta de IL-2. En algunos aspectos, IL-2 es la única citocina recombinante agregada al cultivo. En algunas realizaciones, la IL-2 recombinante se añade al medio de cultivo en una concentración entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, tal como entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 4000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, 2000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 4000 UI/ml, 4000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 UI/ml y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 6000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 6000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml o entre o aproximadamente 7000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-2 recombinante está presente en una cantidad que es o es aproximadamente 6000 UI/ml.

60 En algunas realizaciones, la IL-15 recombinante está presente en el medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la IL-15 recombinante se añade al medio de cultivo a una concentración entre o aproximadamente 10 UI/ml y 500 UI/ml, tal como entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 70 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 50 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 30 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y 500 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o

aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o aproximadamente 70 UI/ml, entre o aproximadamente 30 UI/ml y o aproximadamente 50 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 70 UI/ml, entre o aproximadamente 70 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml, entre o aproximadamente 70 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 70 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 70 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 70 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 300 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, o entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 500 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-15 se añade al medio de cultivo en una cantidad entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-15 se añade al medio de cultivo a o aproximadamente 180 UI/ml.

En algunas realizaciones, se añade IL-7 recombinante al medio de cultivo. En algunas realizaciones, la IL-7 recombinante se añade al medio de cultivo a una concentración entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 800 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 800 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 800 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 600 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 600 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 600 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 800 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml y o aproximadamente 800 UI/ml, entre o aproximadamente 800 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 800 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 800 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 1500 UI/ml, entre o aproximadamente 1500 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-7 se añade al medio de cultivo en una cantidad entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-7 se añade al medio de cultivo a o aproximadamente 600 UI/ml.

En algunas realizaciones, se añade IL-21 recombinante al medio de cultivo. En algunas realizaciones, la IL-21 recombinante se añade al medio de cultivo a una concentración entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 20 UI/ml, entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 15 UI/ml, entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 10 UI/ml, entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 5 UI/ml, entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 2,5 UI/ml, entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 1 UI/ml, entre o aproximadamente 1 UI/ml y o aproximadamente 20 UI/ml, entre o aproximadamente 1 UI/ml y o aproximadamente 15 UI/ml, entre o aproximadamente 1 UI/ml y o aproximadamente 10 UI/ml, entre o aproximadamente 1 UI/ml y o aproximadamente 5 UI/ml, entre o aproximadamente 1 UI/ml y o aproximadamente 2,5 UI/ml, entre o aproximadamente 2,5 UI/ml y o aproximadamente 20 UI/ml, entre o aproximadamente 2,5 UI/ml y o aproximadamente 15 UI/ml, entre o aproximadamente 2,5 UI/ml y o aproximadamente 10 UI/ml, entre o aproximadamente 2,5 UI/ml y o aproximadamente 5 UI/ml, entre o aproximadamente 5 UI/ml y o aproximadamente 20 UI/ml, entre o aproximadamente 5 UI/ml y o aproximadamente 15 UI/ml, entre o aproximadamente 5 UI/ml y o aproximadamente 10 UI/ml, entre o aproximadamente 5 UI/ml y o aproximadamente 2,5 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 15 UI/ml, o entre o aproximadamente 15 UI/ml y o aproximadamente 20 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-21 se añade al medio de cultivo en una cantidad entre o aproximadamente 0,5 UI/ml y o aproximadamente 2,5 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-21 se añade al medio de cultivo a o aproximadamente 1 UI/ml.

El cocultivo de APC y linfocitos T se puede incubar a una temperatura adecuada para la presentación de péptidos en MHC y la activación de linfocitos T en el cultivo, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 grados Celsius, generalmente al menos aproximadamente 30 grados, y generalmente a o aproximadamente 37 grados Celsius. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo hasta 96 horas. La incubación se puede llevar a cabo durante 24

horas a 96 horas, tal como durante o aproximadamente 24 horas, durante o aproximadamente 36 horas, durante o aproximadamente 48 horas, durante o aproximadamente 60 horas, durante o aproximadamente 72 horas, durante o aproximadamente 84 horas o durante o aproximadamente 96 horas o durante un tiempo entre cualquiera de los anteriores. En realizaciones particulares, el cocultivo se incuba durante 24 a 48 horas.

5 Al final del cocultivo, los linfocitos T reactivos a tumores se separan de las APC presentes en el cocultivo. En algunas realizaciones, la separación puede incluir métodos que seleccionen o eliminen las APC. En algunas realizaciones, la separación puede incluir métodos que seleccionen o retengan positivamente los linfocitos T presentes en el cocultivo. En algunas realizaciones, se pueden seleccionar linfocitos T totales en el cocultivo. En realizaciones particulares, se pueden seleccionar los linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que expresan uno o más marcadores de regulación positiva, por ejemplo, marcadores de activación, asociados con linfocitos T reactivos a tumores.

D. Selección de linfocitos T reactivos a tumores

15 En realizaciones de los métodos proporcionados, los métodos implican el enriquecimiento o la selección de linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que probablemente o se sospecha que sean linfocitos T reactivos a tumores que contienen TCR endógenos que son reactivos a péptidos presentes en las APC seleccionando o aislando linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de regulación positiva de linfocitos T expresados en linfocitos T reactivos o activados (por ejemplo, marcadores de activación) asociados con linfocitos T reactivos a tumores. En algunas realizaciones, los linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de activación se seleccionan o enriquecen adicionalmente de la tercera población de linfocitos T que han sido aislados o seleccionados de una muestra biológica, tal como se describe en la Sección I.B.1, en un sistema cerrado para producir una cuarta población que contenga los linfocitos T seleccionados. En algunas realizaciones, los linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de activación se seleccionan o enriquecen adicionalmente de la población de linfocitos T estimulados, tal como se describe en la Sección I.B.2. En algunas realizaciones, los linfocitos T que son positivos para uno o más marcadores de superficie de activación se seleccionan o enriquecen adicionalmente de una población de linfocitos T después de su cocultivo con APC, tal como se describe en la Sección I.C. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir una combinación de cualquiera de las selecciones anteriores para obtener o enriquecer linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que probablemente o se sospecha que sean linfocitos T reactivos a tumores. En algunas realizaciones, la población enriquecida de células se utiliza en etapas de procesamiento posteriores, tales como etapas de procesamiento posteriores que implican incubación, estimulación o activación, y/o expansión de acuerdo con una o más etapas de cualquiera de los métodos proporcionados.

35 En los aspectos de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, los linfocitos T reactivos a tumores y/o los linfocitos T que expresan al menos un marcador de activación de linfocitos T asociado con linfocitos T reactivos a tumores se enriquecen a partir de una muestra biológica de acuerdo con cualquiera de los métodos proporcionados. En algunos aspectos, antes o al mismo tiempo que el enriquecimiento, los linfocitos T pueden enriquecerse o seleccionarse a partir de una muestra biológica, tal como en función de los marcadores de linfocitos T CD3, CD4 o CD8. En algunas realizaciones, el enriquecimiento para un linfocito T que es positivo en superficie para uno o más marcadores de superficie celular incluye cualquier método de separación basado en dichos marcadores. En algunas realizaciones, la separación es una separación basada en afinidad o inmunofinidad. Por ejemplo, el aislamiento en algunos aspectos incluye la separación de células y poblaciones de células en función de la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, típicamente marcadores de superficie celular, por ejemplo, por incubación con un anticuerpo o un miembro de unión que se une específicamente a dichos marcadores, seguido generalmente por etapas de lavado y separación de las células que se han unido al anticuerpo o al miembro de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o al miembro de unión.

50 Antes de la expansión adicional de los linfocitos T del cocultivo, los métodos proporcionados implican además el enriquecimiento o la selección de linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que probablemente o se sospecha que sean linfocitos T reactivos a tumores. En algunas realizaciones, dicho enriquecimiento incluye seleccionar o aislar linfocitos T del cocultivo que sean positivo para uno o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores. En algunas realizaciones, los linfocitos T seleccionados del cocultivo dan como resultado una población de linfocitos T enriquecida en linfocitos T CD3+ o linfocitos CD4+ y linfocitos CD8+, que son además positivos para uno o más de tales marcadores de activación de linfocitos T. En algunas realizaciones, dichas células incluyen o están enriquecidas con linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores. Por ejemplo, dichos linfocitos T CD3+, o poblaciones CD4+ y/o CD8+, se pueden clasificar además en subpoblaciones mediante selección positiva o negativa para marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en linfocitos T reactivos a tumores o en linfocitos T que tienen expresión de marcadores de activación de linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores. En realizaciones particulares, la población enriquecida de células se cultiva en condiciones de expansión, tales como se describe en la Sección I.E.

65 En algunos aspectos, se lleva a cabo una selección positiva para uno o más marcadores de activación de linfocitos T. Cuando un linfocito T es activado por un péptido diana o mutante, comienza a expresar marcadores de regulación positiva tales como, pero sin limitación, CD107, CD107a, CD39, CD103, CD137 (4-1BB), CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134 (OX40), CD258, CD256, PD-1, TIM-3 y/o LAG-3. En realizaciones particulares, el marcador de regulación positiva es CD107, CD107a, CD39, CD137, CD59, CD90, CD38 o CD103. Estos marcadores pueden

usarse luego para seleccionar células reactivas. En particular, entre los marcadores de activación de linfocitos T se encuentran aquellos que están regulados positivamente y/o cuya expresión se detecta específicamente después de la estimulación antigénica de los linfocitos T, de modo que los efectores específicos de antígeno puedan identificarse como un sustituto de un antígeno que está activando o estimulando las células. Por ejemplo, después de la estimulación inducida por antígeno, los linfocitos T humanos experimentan cambios dinámicos funcionales y fenotípicos, incluida la expresión superficial regulada positivamente de múltiples moléculas asociadas a la activación, tales como CD25, CD69, CD38 y otros. La regulación positiva de las moléculas de superficie brinda la oportunidad de identificar y aislar linfocitos T específicos de antígeno, tales como los linfocitos T reactivos a tumores, a través de la unión de anticuerpos del determinante regulado positivamente y el posterior enriquecimiento mediante citometría de flujo, incluso mediante métodos que implican separación magnética y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T se selecciona para uno cualquiera o más de CD107, CD107a, CD39, CD103, CD137 (4-1BB), CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134, CD258, CD256, PD-1, TIM-3 y/o LAG-3. En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T se selecciona de uno cualquiera o más de CD107, CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134, CD258 y/o CD256. En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T se selecciona de uno cualquiera o más de CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90 y/o CD38.

En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T es o incluye CD107a. CD107a es una proteína asociada a lisosomas que normalmente se encuentra en la superficie de los linfocitos T. Al activarse el TCR, la desgranulación de los linfocitos T CD8 puede ocurrir rápidamente y CD107 y otras proteínas lisosomales pueden transportarse a la membrana celular para facilitar la liberación de perforina y granzima. Por ejemplo, en algunos casos, la expresión de CD107 se puede detectar en linfocitos T CD8 específicos de antígeno, tal como tan pronto como 30 minutos después de la estimulación. (Betts *et al.* (2003) *J. Immunol. Methods* 281:6578).

En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T es o incluye CD39. En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T es o incluye CD103. En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T es o incluye CD59. En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T es o incluye CD90. En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T es o incluye CD38.

En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T es o incluye CD137 (41BB). En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T es o incluye CD134 (OX40).

En algunas realizaciones, los linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores se seleccionan, enriquecen o aíslan basándose en la expresión positiva de al menos dos o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T, tales como al menos 3, 4, 5 o 6 marcadores de activación de linfocitos T. En algunas realizaciones, los linfocitos T reactivos a tumores o los linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores se seleccionan, enriquecen o aíslan basándose en la expresión positiva de superficie de al menos dos o más de PD-1, TIM-3, LAG-3, CD137, CD107, CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134, CD258 y/o CD256.

En algunas realizaciones, los al menos dos marcadores de activación de linfocitos T se seleccionan de CD107a y CD39, CD107a y CD103, CD107a y CD59, CD107a y CD90, CD107a y CD38, CD39 y CD103, CD39 y CD59, CD39 y CD90, CD39 y CD38, CD103 y CD59, CD103 y CD90, CD103 y CD38, CD59 y CD90, CD59 y CD38 y CD90 y CD38.

En algunas realizaciones, los linfocitos T reactivos a tumores o los linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores se seleccionan, enriquecen o aíslan basándose en la expresión superficial positiva de PD-1, TIM-2, LAG-3 y/o CD137 y al menos otro marcador de activación de linfocitos T. En algunas realizaciones, los linfocitos T reactivos a tumores o los linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores se seleccionan, enriquecen o aíslan basándose en la expresión superficial positiva de CD137 y al menos otro marcador de activación de linfocitos T. En algunas realizaciones, el al menos otro marcador de activación de linfocitos T se selecciona de uno o más de PD-1, TIM-3, LAG-3, CD107, CD107a, CD137, CD39, CD103, CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134, CD258 y CD256. En algunas realizaciones, el al menos otro marcador de activación de linfocitos T se selecciona de uno o más de CD107, CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134, CD258 y CD256. En algunas realizaciones, el al menos otro marcador de activación de linfocitos T se selecciona de uno o más de CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90 y CD38. En algunas realizaciones, los linfocitos T reactivos a tumores o los linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores se seleccionan, enriquecen o aíslan basándose en la expresión superficial positiva de CD107a y CD137, CD38 y CD137, CD103 y CD137, CD59 y CD137, CD90 y CD137 y CD38 y CD137.

En algunas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T incluye CD137 (41BB) y CD134 (OX40).

En algunas realizaciones, los linfocitos T reactivos a tumores se seleccionan utilizando un tetrámero de MHC unido a un péptido asociado a una mutación o a un tumor. En algunas realizaciones, los tetrámeros se preparan utilizando algoritmos de MHC clase I o MHC clase II. En algunas realizaciones, el tetrámero está marcado de forma detectable,

tal como los marcajes con fluorescencia. En algunas realizaciones, el tetrámero tiene compatibilidad HLA con el sujeto del que se obtiene la fuente de células biológicas. En algunas realizaciones, la selección de células utilizando un tetrámero de MHC proviene directamente de una fuente celular, por ejemplo, sangre periférica, para una muestra de un sujeto. En algunas realizaciones, la selección de células utilizando un tetrámero de MHC se realiza después de
5 seleccionar o enriquecer linfocitos T que son positivos para un marcador de superficie de activación de linfocitos T.

Los métodos de aislamiento, selección y/o enriquecimiento de células puede realizarse mediante cualquiera de una variedad de métodos, tal como por selección positiva o negativa basada, tal como mediante el uso de cualquier método como se describe en la Sección I.B anterior. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir selecciones basadas
10 en inmunoafinidad. En algunas realizaciones, los linfocitos T se pueden enriquecer o clasificar de diversas formas, entre ellas, pero sin limitación, separación de perlas magnéticas, clasificación de células fluorescentes y clasificadores de células desechables basados en cartuchos cerrados. En aspectos particulares, se pueden usar uno o más marcadores de activación de linfocitos T para seleccionar células reactivas usando, pero sin limitación, anticuerpos fluorescentes, nanopartículas o perlas en equipos de selección celular, pero sin limitación, el CliniMACS, Sony FX500
15 o los sistemas de clasificación de células Tyto (Miltenyi).

En algunas realizaciones, las selecciones producen una población enriquecida de células, tal como una población de células enriquecida en linfocitos T CD3+ o linfocitos CD4+ y linfocitos CD8+, que son además positivos para uno o más de tales marcadores de activación de linfocitos T. En algunas realizaciones, dichas células incluyen o están
20 enriquecidas con linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T asociados con linfocitos T reactivos a tumores. En algunas realizaciones, la población enriquecida de células se utiliza en etapas de procesamiento posteriores, tales como etapas de procesamiento posteriores que implican incubación, estimulación o activación, y/o expansión de acuerdo con una o más etapas de cualquiera de los métodos proporcionados.

En algunas realizaciones, la población enriquecida de células son células enriquecidas de una muestra inicial como se ha descrito anteriormente, en la que el porcentaje de células de un fenotipo particular, por ejemplo, linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T, en la población de células enriquecida se incrementa en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 500 %, 1000 %, 5000 % o más que el porcentaje de dichas células en la muestra inicial.
25 En algunas realizaciones, la pureza de los linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T en la composición enriquecida, es decir, el porcentaje de células positivas para el marcador de superficie celular seleccionado frente al total de células en la población de células enriquecidas, es al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, y generalmente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más.
30

35 **E. Expansión y cosecha posterior**

Los linfocitos T del cocultivo, o los linfocitos T seleccionados del mismo, se incuban adicionalmente en condiciones para expandir las células *ex vivo* después del cocultivo. La incubación se lleva a cabo en presencia de uno o más
40 agentes estimuladores de linfocitos T en condiciones para estimular los linfocitos T, tal como para expandir los linfocitos T en un sistema cerrado usando medio sin suero para producir una composición de linfocitos T expandidos para usar como una composición celular terapéutica, en donde el uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante. El agente estimulador de linfocitos T puede incluir cualquiera de los descritos en la Sección B.2 anterior.
45

En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el o los agentes estimuladores de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante, opcionalmente en donde uno o más agentes estimuladores de linfocitos T adicionales se seleccionan de un agente que inicia la señalización intracelular de TCR/CD3 y/o un agente que inicia la señalización a través de un receptor coestimulador. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el agente que
50 inicia la señalización intracelular de TCR/CD3 es un anticuerpo anti-CD3, tal como OKT3. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el agente que inicia la señalización a través de un receptor coestimulador comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC), opcionalmente PBMC irradiadas o que no se dividen. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el agente que inicia la señalización a través de un receptor coestimulador es un anticuerpo anti-CD28. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el
55 agente estimulador de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, cada uno de los cuales es soluble.

En realizaciones de los métodos proporcionados, las condiciones estimulantes incluyen uno o más agentes, p. ej., ligando, que activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en un linfocito T y/o una señal coestimuladora en un linfocito T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales como los específicos para un componente TCR, p. ej., anti-CD3 y/o receptor coestimulador, por ejemplo, anti-CD28 o anti-4-1BB. En algunas realizaciones, dichos agentes se añaden al medio de cultivo como anticuerpos solubles. En otras realizaciones, tales agentes están unidos a un soporte sólido tal como una perla. En algunas realizaciones, el agente o agentes
60 estimuladores de linfocitos T incluye perlas magnéticas conjugadas con anti-CD3/CD28 (p. ej., DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).
65

5 Un anticuerpo anti-CD3 puede incluir cualquier anticuerpo dirigido contra o que pueda unirse específicamente al receptor CD3 en la superficie de los linfocitos T, normalmente CD3 humano en linfocitos T humanos. Los anticuerpos anti-CD3 incluyen OKT3, también conocido como muromonab. Los anticuerpos anti-CD3 también incluyen el clon UHCT1, también conocido como T3 y CD3E. Otros anticuerpos anti-CD3 incluyen, por ejemplo, oteлизumab, teplizumab y visilizumab. El anticuerpo anti-CD3 puede agregarse como reactivo soluble o unido a una perla. En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-CD3 es soluble.

10 En realizaciones particulares, el o los agentes estimuladores de linfocitos T incluyen un anticuerpo anti-CD3, que se añade al medio de cultivo celular durante la incubación. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 se añade a una concentración que varía entre o aproximadamente 0,1 ng/ml y 50 ng/ml, tal como entre o aproximadamente 0,5 ng/ml y o aproximadamente 50 ng/ml, entre o aproximadamente 0,5 ng/ml y o aproximadamente 30 ng/ml, entre o aproximadamente 0,5 ng/ml y o aproximadamente 15 ng/ml, entre o aproximadamente 0,5 ng/ml y o aproximadamente 5 ng/ml, entre o aproximadamente 0,5 ng/ml y o aproximadamente 1 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 30 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 15 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 5 ng/ml, entre o aproximadamente 5 ng/ml y o aproximadamente 50 ng/ml, entre o aproximadamente 5 ng/ml y o aproximadamente 30 ng/ml, entre o aproximadamente 5 ng/ml y o aproximadamente 15 ng/ml, entre o aproximadamente 15 ng/ml y o 50 ng/ml, entre o aproximadamente 15 ng/ml y o aproximadamente 30 ng/ml o entre o aproximadamente 30 ng/ml y o aproximadamente 50 ng/ml, cada uno inclusive.

20 En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-CD3 es OKT3. 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 de anticuerpo OKT3. 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 OKT3.

35 En algunas realizaciones, el agente o agentes estimuladores de linfocitos T incluye la incubación con un anticuerpo anti-CD3 y la incubación con un agente adicional que se une específicamente a CD28 o estimula o induce una señal mediada por CD28 en las células. En algunas realizaciones, la señal mediada por CD28 puede iniciarse o proporcionarse mediante un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, la señal mediada por CD28 puede ser proporcionada por células alimentadoras presentadoras de antígeno (APC), tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

40 En algunas realizaciones, el o los agentes estimuladores de linfocitos T pueden incluir la adición a la población de células alimentadoras de linfocitos T, tales como las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que no se dividen. En algunos aspectos, las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células alimentadoras PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunas realizaciones, las PBMC se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads para evitar la división celular. En algunos aspectos, las células alimentadoras se añaden al medio de cultivo antes de la adición de las poblaciones de linfocitos T. En algunas realizaciones, la población de células resultante contiene al menos aproximadamente 5, 10, 20 o 40 o más células alimentadoras PBMC por cada linfocito T en la población inicial que se va a expandir. En algunas realizaciones, la proporción entre linfocitos T y PBMC y/o células presentadoras de antígeno es de aproximadamente 1 a 25, de aproximadamente 1 a 50, de aproximadamente 1 a 100, de aproximadamente 1 a 125, de aproximadamente 1 a 150, de aproximadamente 1 a 175, de aproximadamente 1 a 200, de aproximadamente 1 a 225, de aproximadamente 1 a 250, de aproximadamente 1 a 275, de aproximadamente 1 a 300, de aproximadamente 1 a 325, de aproximadamente 1 a 350, de aproximadamente 1 a 375, de aproximadamente 1 a 400 o de aproximadamente 1 a 500.

55 En algunas realizaciones, el o los agentes estimuladores de linfocitos T puede incluir la adición a la población de células de un anticuerpo anti-CD28 o de un fragmento de unión a antígeno del mismo. Un anticuerpo anti-CD28 puede incluir cualquier anticuerpo dirigido contra el receptor CD28 en la superficie de los linfocitos T o que pueda unirse específicamente al mismo. Los ejemplos no limitativos de anticuerpos anti-CD28 incluyen NA/LE (por ejemplo, BD Pharmingen), IM1376 (por ejemplo, Beckman Coulter), o 15E8 (por ejemplo, Miltenyi Biotec). El anticuerpo anti-CD28 puede agregarse como reactivo soluble o unido a una perla. En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-CD3 es soluble. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD28 se añade a una concentración que varía entre o aproximadamente 1 ng/ml y 1000 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y 500 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 100 ng/ml, entre o aproximadamente 1 ng/ml y o aproximadamente 10 ng/ml, entre o aproximadamente 10 ng/ml y o aproximadamente 1000 ng/ml, entre o aproximadamente 10 ng/ml y o aproximadamente 500 ng/ml, entre o aproximadamente 10 ng/ml y o aproximadamente 100 ng/ml, entre o aproximadamente 100 ng/ml y o aproximadamente 1000 ng/ml, entre o aproximadamente 100 ng/ml y o aproximadamente 500 ng/ml o entre o aproximadamente 500 ng/ml y o aproximadamente 1000 ng/ml.

En general, el cultivo y las incubaciones pueden ocurrir en presencia de citocinas recombinantes. En algunas realizaciones, la citocina se añade o es exógena al medio de cultivo. El cultivo se lleva a cabo en presencia de IL-2 recombinante y opcionalmente una citocina recombinante seleccionada del grupo formado por IL-15, IL-7 y IL-21. En algunas realizaciones, el cultivo y la incubación se llevan a cabo en presencia de IL-2 recombinante, IL-15 y IL-7. El cultivo se lleva a cabo en presencia de una IL-2. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo en presencia de IL-15 e IL-17.

La citocina recombinante generalmente es una proteína humana recombinante. En realizaciones particulares, la citocina recombinante está presente en el medio de cultivo celular durante la incubación a una concentración de al menos o al menos aproximadamente 0,5 UI/ml, de al menos o al menos aproximadamente 1,0 UI/ml, de al menos o al menos aproximadamente 5 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 10 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 100 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 1500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 2500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 3000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 3500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 4000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 4500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 5000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 5500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 6000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 6500 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de o aproximadamente 7000 UI/ml, de al menos o aproximadamente o de aproximadamente 7500 UI/ml, o de al menos o de al menos o aproximadamente o de aproximadamente 8000 UI/ml. En una realización, el medio de cultivo celular comprende entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, y o aproximadamente 100 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, y o aproximadamente 1000 y o aproximadamente 2000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 y o aproximadamente 3000 UI/ml, entre o aproximadamente 3000 y o aproximadamente 4000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 6000 y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 7000 y o aproximadamente 8000 UI/ml, cada uno inclusive.

La IL-2 recombinante está presente en el medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, se añade IL-2 recombinante al medio de cultivo a una concentración entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, tal como entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 100 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 50 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 50 UI/ml y o aproximadamente 200 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml, entre o aproximadamente 200 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml, entre o aproximadamente 400 UI/ml y o aproximadamente 600 UI/ml o entre o aproximadamente 600 UI/ml y o aproximadamente 1000 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-2 recombinante está presente en una cantidad que está entre 50 y 400 UI/ml.

En algunas realizaciones, la incubación se realiza con una dosis más alta de IL-2. En algunos aspectos, IL-2 es la única citocina recombinante agregada al cultivo. En algunas realizaciones, la IL-2 recombinante se añade al medio de cultivo en una concentración entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, tal como entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 4000 UI/ml, entre o aproximadamente 1000 UI/ml y o aproximadamente 2000 UI/ml, 2000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 2000 UI/ml y o aproximadamente 4000 UI/ml, 4000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 4000 UI/ml y o aproximadamente 5000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml, entre o aproximadamente 5000 UI/ml y o aproximadamente 6000 UI/ml, entre o aproximadamente 6000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml, entre o aproximadamente 6000 UI/ml y o aproximadamente 7000 UI/ml o entre o aproximadamente 7000 UI/ml y o aproximadamente 8000 UI/ml. En algunas realizaciones, la IL-2 recombinante está presente en una cantidad que es o es aproximadamente 6000 UI/ml.

En algunas realizaciones, la IL-15 recombinante está presente en el medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la IL-15 recombinante se añade al medio de cultivo a una concentración entre o aproximadamente 10 UI/ml y 500 UI/ml, tal como entre o aproximadamente 10 UI/ml y o aproximadamente 400 UI/ml, entre o aproximadamente 10 UI/ml

Los linfocitos T clasificados o seleccionados se pueden expandir en una o más condiciones estimulantes en un recipiente de cultivo adecuado para la expansión celular. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo es un recipiente de cultivo permeable a los gases, tal como un sistema G-Rex (por ejemplo, G-Rex 10, G-Rex 10M, G-Rex 100 M/100M-CS o G-Rex 500 M/500M-CS). En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo es una microplaca, matraz, barra u otro recipiente de cultivo adecuado para la expansión de células en un sistema cerrado. En algunas realizaciones, la expansión se puede llevar a cabo en un biorreactor. En algunas realizaciones, la composición de linfocitos T expandidos se retira de un sistema cerrado y se coloca y/o se conecta a un biorreactor para su expansión. Los linfocitos T clasificados o seleccionados se pueden expandir usando un sistema de expansión celular mediante transferencia a la célula a bolsas permeables a los gases, tal como en relación con un biorreactor (por ejemplo, Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare)). En una realización, el sistema de expansión celular incluye un recipiente de cultivo, tal como una bolsa, por ejemplo, bolso de células permeables a los gases, con un volumen que es de aproximadamente 50 ml, 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, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, el proceso es automatizado o semiautomatizado. Ejemplos de biorreactores adecuados para la expansión de perfusión automatizada incluyen, pero no se limitan a, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems y Pall XRS Bioreactor Systems o Miltenyi Prodigy. En algunos aspectos, el cultivo de expansión se lleva a cabo en condiciones estáticas. En algunas realizaciones, el cultivo de expansión se lleva a cabo en condiciones de balanceo. El medio se puede añadir en bolo o se puede añadir según un programa de perfusión. En algunas realizaciones, el biorreactor mantiene la temperatura en o cerca de 37 °C y niveles de CO₂ en o cerca del 5 % con un flujo de aire constante de, aproximadamente, o al menos, 0,01 l/min, 0,05 l/min, 0,1 l/min, 0,2 l/min, 0,3 l/min, 0,4 l/min, 0,5 l/min, 1,0 l/min, 1,5 l/min, o 2,0 l/min o más de 2,0 l/min. En determinadas realizaciones, al menos una parte del cultivo se realiza con perfusión, tal como por ejemplo con una tasa de 290 ml/día, 580 ml/día y/o 1160 ml/día.

En algunas realizaciones, las células se siembran en un recipiente de cultivo apropiado (por ejemplo, una bolsa permeable a los gases) a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/ml a $1,5 \times 10^6$ células/ml. En algunas realizaciones, la densidad es de o aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/ml, $0,75 \times 10^6$ células/ml, 1×10^6 células/ml, $1,25 \times 10^6$ células/ml o $1,5 \times 10^6$ células/ml, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores.

En algunos aspectos, las células se expanden en un sistema de expansión cerrado automatizado que está habilitado para perfusión. Las perfusiones pueden agregar continuamente medios a las células para garantizar que se logre una tasa de crecimiento óptima.

En algunas realizaciones, la expansión se lleva a cabo utilizando un biorreactor con sistema de expansión celular Xuri. Las células se pueden sembrar a razón de 0,5-1,5 millones de células por ml. Las células se pueden cultivar en condiciones estáticas o de balanceo. El medio se puede añadir en bolo o según un programa de perfusión. En las realizaciones, el biorreactor mantiene la temperatura en o alrededor de 37 °C y los niveles de CO₂ en alrededor del 5 %. El volumen del cultivo se puede mantener en aproximadamente 0,5 l a 1,0 l. En algunas realizaciones, la expansión se lleva a cabo durante 7-14 días tal como 7-10 días. En algunos aspectos, la expansión da como resultado entre 100 millones y 50 mil millones de células después de la expansión y/o una expansión de 10 a 1000 veces.

En algunas realizaciones, la expansión se lleva a cabo utilizando un biorreactor Miltenyi Prodigy. Las células se pueden sembrar a razón de 0,5-1,5 millones de células por ml. Las células se pueden cultivar en condiciones estáticas o de agitación. El medio se puede añadir en bolo o según un programa de perfusión. En las realizaciones, el biorreactor mantiene la temperatura en o alrededor de 37 °C y los niveles de CO₂ en alrededor del 5 %. El volumen del cultivo se puede mantener en aproximadamente 70 ml a 400 ml. En algunas realizaciones, la expansión se lleva a cabo durante 7-14 días tal como 7-10 días. En algunos aspectos, la expansión da como resultado entre 100 millones y 3 mil millones de células después de la expansión y/o una expansión de 10 a 1000 veces.

En algunas realizaciones, la expansión se lleva a cabo usando una bolsa permeable a los gases. Las células se pueden sembrar a razón de 0,5-1,5 millones de células por ml. Las células se pueden cultivar en condiciones estáticas. En las realizaciones, el biorreactor mantiene la temperatura en o alrededor de 37 °C y los niveles de CO₂ en alrededor del 5 %. En dichos aspectos, cuando la concentración celular supera los 2,0 millones de células por ml, se puede añadir medio para llevar la concentración celular a entre 0,5 y 1,0 millones de células por ml. Si el volumen alcanza el volumen máximo de la bolsa, las células se agregarán a una bolsa más grande o a varias bolsas para cultivo en las mismas condiciones. En algunas realizaciones, la expansión se lleva a cabo durante 7-14 días tal como 7-10 días.

Los métodos de expansión se llevan a cabo en condiciones GMP, incluso en un sistema automatizado cerrado y utilizando un medio sin suero. Una o más de las etapas del método se llevarán a cabo en un sistema cerrado o en condiciones GMP. En determinadas realizaciones, todas las operaciones del proceso se realizan en un entorno GMP. Se utiliza un sistema cerrado para llevar a cabo una o más de las otras etapas de procesamiento de un método para fabricar, generar o producir una terapia celular. En algunas realizaciones, una o más o todas las etapas del procesamiento, p. ej., etapas de aislamiento, selección y/o enriquecimiento, procesamiento, cultivo que incluyen la

incubación en relación con la expansión de las células, y las etapas de formulación se llevan a cabo usando un sistema, dispositivo o aparato en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunos aspectos, el sistema o aparato incluye un ordenador y/o un programa informático en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado de y/o ajustar diversos aspectos de las etapas de procesamiento, aislamiento, ingeniería y formulación.

En algunas realizaciones, la incubación con el o los agentes estimuladores de linfocitos T para la expansión de células reactivas a tumores se lleva a cabo durante o aproximadamente 1 día, tal como generalmente durante o aproximadamente 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, o cualquier intervalo de tiempo entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, la incubación con el o los agentes estimuladores de linfocitos T para la expansión de células reactivas a tumores se lleva a cabo durante 7-21 días, tal como 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días o 21 días, o cualquier valor entre cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante 7-14 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante 7-10 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 7 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 8 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 9 días. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 10 días. En algunos casos, los medios se pueden intercambiar diariamente, cada dos días, cada tres días, cada 5º día o una vez a la semana durante el tiempo del cultivo o incubación. En algunas realizaciones, los agentes estimulantes (p. ej. citocinas, anti-CD3) se reponen en cada cambio de medio.

En algunas realizaciones, los métodos de cultivo para células en expansión de acuerdo con cualquiera de los métodos proporcionados se llevan a cabo hasta que se obtiene una cantidad umbral de células, tales como células reactivas a tumores o células positivas para uno o más marcadores de activación de linfocitos T. En algunas realizaciones, el método de cultivo para células en expansión de acuerdo con cualquiera de los métodos proporcionados se lleva a cabo hasta 30 días desde el momento del enriquecimiento de los linfocitos. En algunas realizaciones, el método de cultivo para células en expansión de acuerdo con cualquiera de los métodos proporcionados se lleva a cabo hasta 20 días después del inicio de la primera expansión. En algunas realizaciones, el método de cultivo para células en expansión de acuerdo con cualquiera de los métodos proporcionados se lleva a cabo hasta 20 días después del inicio del cocultivo. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, la recogida se lleva a cabo dentro de los 20 días posteriores al inicio del cultivo y/o el enriquecimiento de linfocitos T que comprenden células reactivas a tumores. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, las células se recogen de 7 a 20 días, 7 a 14 días, 7 a 10 días, 10 a 20 días, 10 a 14 días o 14 a 20 días después del inicio del cultivo. Se entiende que la referencia al número de días se refiere a los días en los que las células están presentes en un cultivo y no incluye el tiempo en el que las células de una cualquiera o más de las etapas pueden almacenarse en condiciones de criopreservación.

En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el cultivo se lleva a cabo hasta que se alcanza una cantidad umbral de células que está entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 50×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 30×10^9 células totales o células viables totales, entre $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 12×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 60×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 15×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 8×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $0,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 1×10^9 células totales o células viables totales, entre 1×10^8 y o aproximadamente 50×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente 30×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente 12×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente 60×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente 15×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente 8×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 1×10^8 y o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 50×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 30×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 12×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 60×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 15×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente $3,5 \times 10^8$ y o aproximadamente 8×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 8×10^8 y o aproximadamente 50×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 8×10^8 y o aproximadamente 30×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 8×10^8 y o aproximadamente 12×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 8×10^8 y o aproximadamente 60×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 8×10^8 y o aproximadamente 15×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 15×10^8 y o aproximadamente 50×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 15×10^8 y o aproximadamente 30×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 15×10^8 y o aproximadamente 12×10^9 células totales o células viables totales, entre o

aproximadamente 15×10^8 y o aproximadamente 60×10^8 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 60×10^8 y o aproximadamente 50×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 60×10^8 y o aproximadamente 30×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 60×10^8 y o aproximadamente 12×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 12×10^9 y o aproximadamente 50×10^9 células totales o células viables totales, entre o aproximadamente 12×10^9 y o aproximadamente 30×10^9 células totales o células viables totales, o entre o aproximadamente 30×10^9 y o aproximadamente 60×10^9 células totales o células viables totales, cada uno inclusive.

En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el método da como resultado una expansión de linfocitos T o una expansión de linfocitos T reactivos a tumores que es al menos o aproximadamente 2 veces, al menos o aproximadamente 5 veces, al menos o aproximadamente 10 veces, al menos o aproximadamente 25 veces, al menos o aproximadamente 50 veces, al menos o aproximadamente 100 veces, al menos o aproximadamente 250 veces, al menos o aproximadamente 500 veces, al menos o aproximadamente 1000 veces, o más.

Al alcanzar una dosis terapéutica tras la expansión el producto se puede concentrar y congelar en medio de crioconservación. También se proporcionan en el presente documento poblaciones de linfocitos T producidas mediante métodos descritos en el presente documento y composiciones farmacéuticas de los mismos.

Composiciones y formulaciones farmacéuticas

También describimos composiciones que contienen linfocitos T expandidos, tales como los producidos mediante cualquiera de los métodos proporcionados. En algunas divulgaciones, las composiciones contienen linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que contienen un TCR endógeno específico de un antígeno asociado a tumores, por ejemplo, neoantígeno. En particular, entre las composiciones proporcionadas se encuentran composiciones de células que están enriquecidas en linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T que contienen un TCR endógeno específico de un antígeno asociado a tumores, por ejemplo, neoantígeno.

En algunas divulgaciones, la composición comprende aproximadamente 5-99 % de linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T positivos para el uno o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T, o cualquier porcentaje de dichas células entre 5 y 99 % inclusive. En algunas divulgaciones, la composición puede incluir porcentajes mayores o aumentados de linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o de linfocitos T CD3+ positivos para el uno o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T con respecto al total de linfocitos T CD3+ o células totales en la composición en comparación con el porcentaje de tales linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o de linfocitos T CD3+ positivos para el uno o más marcadores de superficie de activación de linfocitos T con respecto al total de linfocitos T CD3+ o células totales presentes de forma natural en el sujeto o muestra biológica de la que se aislaron las células. En algunas divulgaciones, el porcentaje aumenta al menos o al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces o más. En dichas divulgaciones, el uno o más marcadores de activación de linfocitos T pueden ser cualquiera de los descritos, tales como uno cualquiera o más de CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90 y/o CD38.

En algunas divulgaciones, la composición puede incluir al menos el o aproximadamente el 20 %, al menos el o aproximadamente el 30 %, al menos el o aproximadamente el 40 %, al menos el o aproximadamente el 50 %, al menos el o aproximadamente el 60 %, al menos el o aproximadamente el 65 %, al menos el o aproximadamente el 70 %, al menos el o aproximadamente el 75 %, al menos el o aproximadamente el 80 %, al menos el o aproximadamente el 81 %, al menos el o aproximadamente el 82 %, al menos el o aproximadamente el 83 %, al menos el o aproximadamente el 84 %, al menos el o aproximadamente el 85 %, al menos el o aproximadamente el 86 %, al menos el o aproximadamente el 87 %, al menos el o aproximadamente el 88 %, al menos el o aproximadamente el 89 %, al menos el o aproximadamente el 90 %, al menos el o aproximadamente el 91 %, al menos el o aproximadamente el 92 %, al menos el o aproximadamente el 93 %, al menos el o aproximadamente el 94 %, al menos el o aproximadamente el 95 %, al menos el o aproximadamente el 96 %, al menos el o aproximadamente el 97 %, al menos el o aproximadamente el 98 %, al menos el o aproximadamente el 99 %, o sustancialmente el 100 % de linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, la composición comprende más del 30 % de linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, la composición comprende más del 40 % de linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, la composición comprende más del 50 % de linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, la composición comprende más del 60 % de linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, la composición comprende más del 70 % de linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, la composición comprende más del 80 % de linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, la composición comprende más del 90 % de linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En dichas divulgaciones, el uno o más marcadores de activación de linfocitos T pueden ser cualquiera de los descritos, tales como uno cualquiera o más de CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90 y/o CD38. En dichas divulgaciones, el uno o más

marcadores de activación de linfocitos T pueden ser CD134 y/o CD137.

En algunas divulgaciones, los linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o los linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación pueden estar presentes en la composición en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad eficaz de células puede variar dependiendo del paciente, así como del tipo, gravedad y extensión de la enfermedad. Por tanto, un médico puede determinar cuál es una cantidad eficaz después de considerar la salud del sujeto, la extensión y gravedad de la enfermedad y otras variables.

En determinadas divulgaciones, el número de dichas células en la composición es una cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas divulgaciones, la cantidad es una cantidad que reduce la gravedad, la duración y/o los síntomas asociados con el cáncer, infección vírica, infección microbiana o choque séptico en un animal. En algunas divulgaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es una dosis de células que da como resultado una reducción del crecimiento o la propagación del cáncer en al menos el 2,5 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 25 %, al menos el 35 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, en al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 99 % en un paciente o un animal al que se le ha administrado una composición descrita en el presente documento con respecto al crecimiento o propagación del cáncer en un paciente (o un animal) o un grupo de pacientes (o animales) a los que no se les ha administrado la composición. En algunas divulgaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que da como resultado una actividad citotóxica que da como resultado una actividad para inhibir o reducir el crecimiento del cáncer, las células virales y microbianas.

En algunas divulgaciones, la composición comprende una cantidad de linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación que es de o aproximadamente 10^5 y o aproximadamente 10^{12} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, o de o aproximadamente 10^5 a o aproximadamente 10^8 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, o de o aproximadamente 10^6 y o aproximadamente 10^{11} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, o de o aproximadamente 10^8 y o aproximadamente 10^{11} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, o de o aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, la composición comprende más de o más de o aproximadamente 10^5 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^6 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^7 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^8 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^9 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^{10} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^{11} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^{12} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, tal cantidad puede administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o afección, tal como un paciente con cáncer. En dichas divulgaciones, el uno o más marcadores de activación de linfocitos T pueden ser cualquiera de los descritos, tales como uno cualquiera o más de CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90 y/o CD38. En algunas divulgaciones, el uno o más marcadores de activación de linfocitos T es CD134 y/o CD137.

En algunas divulgaciones, la composición comprende linfocitos T CD3+ como un porcentaje del total de células en la población que es más de o más de aproximadamente el 60 %, más de o más de aproximadamente el 70 %, más de o más de aproximadamente el 80 %, más de o más de aproximadamente el 90 %, o más o más de aproximadamente el 95 %. En algunas divulgaciones, la composición contiene linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ como un porcentaje del total de células en la población que es más de o más de aproximadamente el 60 %, más de o más de aproximadamente el 70 %, más de o más de aproximadamente el 80 %, más de o más de aproximadamente el 90 %, o más o más de aproximadamente el 95 %. En divulgaciones particulares, la composición contiene una proporción entre linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ que está entre o aproximadamente 1:100 y o aproximadamente 100:1, entre o aproximadamente 1:50 y o aproximadamente 50:1, entre o aproximadamente 1:25 y o aproximadamente 25:1, entre o aproximadamente 1:10 y o aproximadamente 10:1, entre o aproximadamente 1:5 y o aproximadamente 5:1, o entre o aproximadamente 1:2,5 y o aproximadamente 2,5:1.

En algunas divulgaciones, el volumen de la composición es al menos o al menos aproximadamente 10 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml o 500 ml, tal como de o de aproximadamente 10 ml a 500 ml, de 10 ml a 200 ml, de 10 ml a 100 ml, de 10 ml a 50 ml, de 50 ml a 500 ml, de 50 ml a 200 ml, de 50 ml a 100 ml, de 100 ml a 500 ml, de 100 ml a 200 ml o de 200 ml a 500 ml, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, la composición tiene una densidad celular de al menos o al menos aproximadamente 1×10^5 células/ml, 5×10^5 células/ml, 1×10^6 células/ml, 5×10^6 células/ml, 1×10^7 células/ml, 5×10^7 células/ml o 1×10^8 células/ml. En algunas divulgaciones, la densidad celular de la composición está entre o entre aproximadamente 1×10^5 células/ml y 1×10^8 células/ml, 1×10^5 células/ml y 1×10^7 células/ml, 1×10^5 células/ml y 1×10^6 células/ml, 1×10^6 células/ml y 1×10^7 células/ml, 1×10^6 células/ml y 1×10^8 células/ml.

células/ml, 1×10^6 células/ml y 1×10^7 células/ml o 1×10^7 células/ml y 1×10^8 células/ml, cada uno inclusive.

Entre las composiciones se encuentran composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración, tal como para la terapia celular adoptiva. En algunas divulgaciones, las células manipuladas genéticamente se formulan con un transportador farmacéuticamente aceptable.

Un transportador farmacéuticamente aceptable puede incluir todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica (Gennaro, 2000, Remington: The science and practice of pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). Los ejemplos de tales transportadores o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y seroalbúmina humana al 5 %. También pueden utilizarse liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones. El transportador farmacéutico debe ser uno que sea adecuado para los linfocitos NK, tal como una solución salina, una solución de dextrosa o una solución que comprende seroalbúmina humana.

En algunas divulgaciones, el transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable para tales composiciones es cualquier solución acuosa no tóxica en la que los linfocitos NK puedan mantenerse o seguir siendo viables, durante un tiempo suficiente para permitir la administración de linfocitos NK vivos. Por ejemplo, el transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una solución salina o una solución salina tamponada. El transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable también puede incluir diversos biomateriales que pueden aumentar la eficiencia de los linfocitos NK. Los vehículos y transportadores celulares pueden, por ejemplo, incluir polisacáridos tales como metilcelulosa (M. C. Tate, D. A. Shear, S. W. Hoffman, D. G. Stein, M. C. LaPlaca, *Biomaterials* 22, 1113, 2001), quitosano (Suh J K F, Matthew H W T. *Biomaterials*, 21, 2589, 2000; Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford D S, *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 51, 586, 2000), Copolímero de N-isopropilacrilamida P(NIPAM-co-AA) (Y. H. Bae, B. Vernon, C. K. Han, S. W. Kim, *J. Control. Release* 53, 249, 1998; H. Gappa, M. Baudys, J. J. Koh, S. W. Kim, Y. H. Bae, *Tissue Eng.* 7, 35, 2001), así como Poli(oxietileno)/poli(ácido D,L-láctico-ácido co-glicólico) (B. Jeong, K. M. Lee, A. Gutowska, Y. H. An, *Biomacromolecules* 3, 865, 2002), P(PF-co-EG) (Suggs L J, Mikos A G. *Cell Trans*, 8, 345, 1999), PEO/PEG (Mann B K, Gobin A S, Tsai A T, Schmedlen R H, West J L., *Biomaterials*, 22, 3045, 2001; Bryant S J, Anseth K S. *Biomaterials*, 22, 619, 2001), PVA (Chih-Ta Lee, Po-Han Kung and Yu-Der Lee, *Carbohydrate Polymers*, 61, 348, 2005), colágeno (Lee C R, Grodzinsky A J, Spector M., *Biomaterials* 22, 3145, 2001), alginato (Bouhadir K H, Lee K Y, Alsberg E, Damm K L, Anderson K W, Mooney D J. *Biotech Prog* 17, 945, 2001; Smidsrd O, Skjak-Braek G., *Trends Biotech*, 8, 71, 1990).

En algunas divulgaciones, la composición es estéril. En algunas divulgaciones, el aislamiento o el enriquecimiento de las células se lleva a cabo en un ambiente cerrado o estéril, por ejemplo, para minimizar el error, la manipulación y/o contaminación del usuario. En algunas divulgaciones, la esterilidad puede conseguirse fácilmente, p. ej., mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

También describimos composiciones que son adecuadas para criopreservar los linfocitos T proporcionadas, incluyendo linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T con superficie positiva para uno o más marcadores de activación. En algunas divulgaciones, la composición comprende un crioprotector. En algunas divulgaciones, el crioprotector es o comprende DMSO y/o glicerol. En algunas divulgaciones, las composiciones formuladas para la criopreservación se pueden almacenar a bajas temperaturas, tal como temperaturas ultrabajas, por ejemplo, almacenamiento con temperaturas que varían de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, tal como o aproximadamente $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 6,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En algunas divulgaciones, las células criopreservadas se preparan para la administración mediante descongelación. En algunos casos, las células se pueden administrar a un sujeto inmediatamente después de descongelarlas. En tales divulgaciones, la composición está lista para usar sin ningún procesamiento adicional. En otros casos, las células se procesan aún más después de la descongelación, tal como mediante resuspensión con un transportador farmacéuticamente aceptable, incubación con un agente activador o estimulante, o se activan, se lavan y se resuspenden en un tampón farmacéuticamente aceptable antes de la administración a un sujeto.

Métodos de tratamiento y aplicaciones terapéuticas

También se describen composiciones y métodos relacionados con las composiciones celulares terapéuticas proporcionadas descritas en el presente documento para usar en el tratamiento de enfermedades o afecciones en un sujeto tal como un cáncer. Dichos métodos y usos incluyen métodos y usos terapéuticos, por ejemplo, que implican la administración de las células terapéuticas, o composiciones que contienen las mismas, a un sujeto que tiene una enfermedad, afección o trastorno. En algunos casos, la enfermedad o trastorno es un tumor o cáncer. En algunas divulgaciones, las células y/o composición farmacéutica de las mismas se administra en una cantidad eficaz para efectuar el tratamiento de la enfermedad o trastorno. Los usos incluyen los usos de las células o composiciones farmacéuticas de las mismas en dichos métodos y tratamientos, y en la preparación de un medicamento para llevar a cabo dichos métodos terapéuticos. En algunas divulgaciones, los métodos de ese modo tratan la enfermedad o afección o trastorno en el sujeto.

En algunas divulgaciones, los métodos de tratamiento comprenden administrar una cantidad eficaz de una composición que contiene linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+, que puede incluir linfocitos T con superficie positiva para uno o más marcadores de activación. Tales composiciones pueden incluir cualquiera de las descritas en el presente documento, incluyendo composiciones producidas mediante los métodos proporcionados.

5 En algunas divulgaciones, a un sujeto (por ejemplo, autólogo) se administra de o aproximadamente 10^5 a o aproximadamente 10^{12} linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, o de o aproximadamente 10^5 a o aproximadamente 10^8 linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, o de o aproximadamente 10^6 a o aproximadamente 10^{12} linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, o de o aproximadamente 10^8 a o aproximadamente 10^{11} linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, o de o aproximadamente 10^9 a o aproximadamente 10^{10} linfocitos T CD3+ producidos mediante cualquiera de los métodos proporcionados. En algunas divulgaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz para la administración comprende más de o más de aproximadamente 10^5 linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, de o aproximadamente 10^6 linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, de o aproximadamente 10^7 linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, de o aproximadamente 10^8 linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, de o aproximadamente 10^9 linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, de o aproximadamente 10^{10} linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, de o aproximadamente 10^{11} linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados, o de o aproximadamente 10^{12} linfocitos T CD3+ producidos por cualquiera de los métodos proporcionados. En algunas divulgaciones, tal cantidad puede administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o afección, tal como un paciente con cáncer. En algunas divulgaciones, el número de linfocitos T que se administran son linfocitos T viables.

25 En algunas divulgaciones, los métodos de tratamiento comprenden administrar una cantidad eficaz de una composición que contiene linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. Tales composiciones pueden incluir cualquiera de las descritas en el presente documento, incluyendo composiciones producidas mediante los métodos proporcionados. En algunas divulgaciones se administran al individuo de o aproximadamente 10^5 a o aproximadamente 10^{12} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, tal como cualquiera como se describe, o de o aproximadamente 10^5 a o aproximadamente 10^8 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, o de o aproximadamente 10^6 a o aproximadamente 10^{12} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, o de o aproximadamente 10^8 a o aproximadamente 10^{11} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, o de o aproximadamente 10^9 a o aproximadamente 10^{10} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz para la administración comprende más de o más de o aproximadamente 10^5 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^6 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^7 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^8 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^9 linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^{10} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, de o aproximadamente 10^{11} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación, o de o aproximadamente 10^{12} linfocitos T CD3+ reactivos a tumores o linfocitos T CD3+ positivos para uno o más marcadores de superficie de activación. En algunas divulgaciones, tal cantidad puede administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o afección, tal como un paciente con cáncer. En algunas divulgaciones, el número de linfocitos T que se administran son linfocitos T viables.

En algunas divulgaciones, la cantidad se administra como una dosis fija. En otras divulgaciones, la cantidad se administra por kilogramo de peso corporal del sujeto.

55 En algunas divulgaciones, la composición, tal como la producida mediante cualquiera de los métodos proporcionados o que contienen linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T positivos para un marcador de superficie de activación de linfocitos T, se administran a un individuo poco después de la expansión de acuerdo con los métodos proporcionados. En otras divulgaciones, los linfocitos T expandidos, tales como los linfocitos T reactivos a tumores o los linfocitos T positivos para un marcador de superficie de activación de linfocitos T expandidos, se crioconservan antes de la administración, tal como mediante los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, los linfocitos T, tales como linfocitos T reactivos a tumores o los linfocitos T positivos para un marcador de superficie de activación de linfocitos T, se pueden conservar durante más de 6, 12, 18 o 24 meses antes de su administración al individuo. Estas células crioconservadas se pueden descongelar antes de la administración.

65 En algunas divulgaciones, las composiciones proporcionadas, tales como los proporcionados por cualquiera de los métodos proporcionados o que contienen linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T positivos para un marcador de

superficie de activación de linfocitos T, pueden administrarse a un sujeto por cualquier vía conveniente, incluidas las vías parenterales tales como las vías de administración subcutánea, intramuscular, intravenosa y/o epidural.

5 En algunas divulgaciones, las composiciones, tales como las proporcionadas por cualquiera de los métodos proporcionados o que contienen linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T positivos para un marcador de superficie de activación de linfocitos T se pueden administrar en una dosis única. Dicha administración puede ser por inyección, p. ej., inyección intravenosa. En algunas divulgaciones, los linfocitos T reactivos a tumores o los linfocitos T positivos para un marcador de superficie de activación de linfocitos T se pueden administrar en dosis múltiples. La dosificación puede ser una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, 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 tales composiciones y células puede continuar tanto tiempo como sea necesario.

15 En algunas divulgaciones, al sujeto se le administra una terapia de reducción de linfocitos antes de la administración de la dosis de células de las composiciones proporcionadas, tales como las producidas mediante cualquiera de los métodos proporcionados o que contienen linfocitos T reactivos a tumores o linfocitos T positivos para un marcador de superficie de activación de linfocitos T. La terapia de reducción de linfocitos puede incluir la administración de fludarabina y/o ciclofosfamida (la forma activa se denomina mafosfamida) y combinaciones de las mismas. Dichos métodos se describen en Gassner *et al.* (Cancer Immunol Immunother. 201 1, 60(l):75-85, Muranski, et al, Nat Clin Pract Oncol, 2006 3(12):668-681, Dudley, *et al.*, J Clin Oncol 2008, 26:5233-5239, and Dudley, *et al.*, J Clin Oncol. 2005, 23(10):2346-2357. En algunas divulgaciones, 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, o una cantidad de dosis entre un intervalo de cualquiera de los anteriores. En algunas divulgaciones, la fludarabina se administra durante 2-7 días, tal como durante 3-5 días, tal como o aproximadamente 3 días, tal como o aproximadamente 4 días o tal como o aproximadamente 5 días. En algunas divulgaciones, la ciclofosfamida se administra a una dosis de 100 mg/m²/día, 150 mg/m²/día, 175 mg/m²/día, 200 mg/m²/día, 225 mg/m²/día, 250 mg/m²/día, 275 mg/m²/día o 300 mg/m²/día. En algunas divulgaciones, la ciclofosfamida se administra por vía intravenosa (es decir, i.v.). En algunas divulgaciones, el tratamiento con ciclofosfamida dura de 2-7 días, tal como 3-5 días, tal como o aproximadamente 3 días, tal como o aproximadamente 4 días o tal como o aproximadamente 5 días. La terapia de reducción de linfocitos se administra antes de las composiciones celulares proporcionadas. En algunas divulgaciones, la terapia de reducción de linfocitos se lleva a cabo una semana después de la administración de las composiciones celulares proporcionadas, tal como 5-7 días antes de la administración de la dosis de células.

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar en un método para tratar trastornos hiperproliferativos. En una divulgación preferida, se utilizan en el tratamiento del cáncer. En algunos aspectos, el 35 cáncer puede ser un melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, leucemia mieloide aguda, cáncer colorrectal y sarcoma. En algunas divulgaciones, el cáncer es un cáncer con una alta carga mutacional. En algunas divulgaciones, el cáncer es melanoma, escamoso del pulmón, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer esofágico, cáncer colorrectal, cáncer de cuello de útero, cáncer de cabeza 40 y cuello, cáncer de estómago o cáncer de útero.

En algunas divulgaciones, el cáncer es un cáncer epitelial. En algunas divulgaciones, el cáncer se selecciona de 45 cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), CRC, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer colangiocarcinoma, cáncer de endometrio. En algunas divulgaciones, el cáncer de mama es cáncer de mama HR+/Her2-. En algunas divulgaciones, el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo (TNBC). En algunas divulgaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama HER2+.

En algunas divulgaciones, el sujeto tiene un cáncer que es un tumor hematológico. Ejemplos no limitantes de tumores hematológicos incluyen leucemias, incluidas las leucemias agudas (tales como leucemia aguda positiva para 1 lq23, 50 leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de la cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y 55 mielodisplasia.

En algunas divulgaciones, el sujeto tiene un cáncer de tumor sólido. Ejemplos no limitativos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiocarcinoma, rhabdomiocarcinoma, 60 carcinoma de colon, neoplasia maligna linfocítica, cáncer pancreático, cáncer de mama (incluido carcinoma de mama basal, carcinoma ductal y carcinoma de mama lobulillar), cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello de 65 útero, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores del SNC (tales como un glioma, astrocitoma,

meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). En varios ejemplos, un tumor es melanoma, cáncer de pulmón, linfoma, cáncer de mama o cáncer de colon.

5 En algunas divulgaciones, el cáncer es un cáncer de piel. En divulgaciones particulares, el cáncer es un melanoma, tal como un melanoma cutáneo. En algunas divulgaciones, el cáncer es una célula de Merkel o un carcinoma cutáneo epidermoide (CSCC) metastásico.

10 En algunas divulgaciones, el tumor es un carcinoma, que es un cáncer que se desarrolla a partir de células epiteliales o es un cáncer de origen epitelial. En algunas divulgaciones, el cáncer surge de las células epiteliales que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, cáncer gastrointestinal, cáncer de labios, cáncer de boca, cáncer esofágico, cáncer de intestino delgado y cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de piel, tal como el cáncer de células escamosas y de células basales, cáncer de próstata, carcinoma de células renales y otros cánceres conocidos que afectan a las células epiteliales de todo el cuerpo.

15 En algunas divulgaciones, el sujeto tiene un cáncer que es un cáncer gastrointestinal que implica un cáncer del tracto gastrointestinal (tracto gastrointestinal), incluyendo cánceres del tracto digestivo superior o inferior, o un órgano accesorio de la digestión, como el esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, recto o ano. En algunas divulgaciones, el cáncer es un cáncer esofágico, cáncer de estómago (gástrico), cáncer pancreático, cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular), cáncer de vesícula biliar, cáncer del tejido linfoide asociado a las mucosas (linfoma MALT), cáncer del árbol biliar, cáncer colorrectal (incluido cáncer de colon, cáncer de recto o ambos), cáncer anal o un tumor carcinoide gastrointestinal. En divulgaciones particulares, el cáncer es un cáncer colorrectal.

20 En algunas divulgaciones, el cáncer es un cáncer colorrectal. El cáncer colorrectal (CRC) es un tumor común de incidencia creciente, el cual, en muchos casos, no responde a la inhibición de puntos de control ni a otra inmunoterapia. Este es el caso a pesar de que estos cánceres tienen propiedades que están asociadas con la respuesta, por ejemplo, una tasa de mutación razonablemente alta y una asociación bien establecida de pronóstico con el nivel de infiltración de linfocitos T.

25 En algunas divulgaciones, el cáncer es un cáncer de ovario. En algunas divulgaciones, el cáncer es un cáncer de mama triple negativo (TNBC).

30 En algunas divulgaciones, el cáncer es cáncer de pulmón. En algunas divulgaciones, el cáncer es un cáncer de mama. En algunas divulgaciones, el cáncer es un cáncer colorrectal. En algunas divulgaciones, el cáncer es cáncer pancreático. En algunas divulgaciones, el cáncer es un cáncer de células de Merkel. En algunas divulgaciones, el cáncer es un carcinoma cutáneo epidermoide (CSCC) metastásico. En algunas divulgaciones, el cáncer es un melanoma.

35 En algunas divulgaciones, el sujeto es aquel cuyo cáncer es resistente o ha recaído después del tratamiento con, un bloqueo del punto de control, tal como terapia con anti-PD1 o anti-PD-L1.

40 En algunas divulgaciones, el sujeto es el mismo sujeto del que se obtuvo la muestra biológica para producir la composición celular terapéutica. En algunas de estas divulgaciones, los métodos de tratamiento proporcionados son una terapia celular adoptiva con una composición terapéutica que contiene linfocitos T autólogos del sujeto.

45 En algunas divulgaciones, las composiciones celulares proporcionadas en el presente documento son autólogas del sujeto que se va a tratar. En dichas divulgaciones, las células de partida para la expansión se aíslan directamente de una muestra biológica del sujeto como se describe en el presente documento, incluyendo en algunos casos el enriquecimiento de linfocitos T positivos para uno o más marcadores de superficie activación de linfocitos T como se describe, y cultivados en condiciones de expansión como se proporciona en el presente documento. En algunos aspectos, la muestra biológica del sujeto es o incluye un tumor o una muestra de ganglio linfático y se obtiene dicha muestra de tumor y una cantidad de dicho tejido, tal como por resección o biopsia (por ejemplo, biopsia con aguja gruesa o aspiración con aguja fina). En algunas divulgaciones, después del cultivo en condiciones de expansión de acuerdo con los métodos proporcionados, las células se formulan y opcionalmente se crioconservan para su posterior administración al mismo sujeto para tratar el cáncer.

50 En algunas divulgaciones, las composiciones celulares proporcionadas en el presente documento son alógenas para el sujeto que se va a tratar. En algunos aspectos, el sujeto del que se derivan o aíslan las células es un sujeto sano o no se sabe que tenga una enfermedad o afecciones, tal como un cáncer. En dichas divulgaciones, las células de partida para la expansión se aíslan directamente de una muestra biológica de un sujeto como se describe en el presente documento, incluyendo en algunos casos el enriquecimiento de linfocitos T positivos para uno o más marcadores de superficie activación de linfocitos T como se describe, y cultivados en condiciones de expansión como se proporciona en el presente documento. En algunos aspectos, la muestra biológica del sujeto es o incluye un tumor o una muestra de ganglio linfático y se obtiene dicha muestra de tumor y una cantidad de dicho tejido, tal como por

resección o biopsia (por ejemplo, biopsia con aguja gruesa o aspiración con aguja fina). En algunas divulgaciones, después del cultivo en condiciones de expansión, las células se formulan y opcionalmente se crioconservan para su posterior administración a un sujeto diferente para tratar un cáncer en dicho sujeto diferente.

5 En algunas divulgaciones, los métodos proporcionados se pueden llevar a cabo con una o más inmunoterapias diferentes. En algunas divulgaciones, la inmunoterapia es un agente inmunomodulador que es un inhibidor del punto de control inmunitario. En algunas divulgaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario se une específicamente a una molécula seleccionada entre CD25, PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, 4-1BB, GITR, CD40, CD40L, OX40, OX40L, CXCR2, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, CD28, TIGIT y VISTA. En algunas divulgaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, una molécula pequeña o un polipéptido. En algunas divulgaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario se selecciona entre nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, MK-3475, BMS-936559, MPDL3280A, ipilimumab, tremelimumab, IMP31, BMS-986016, urelumab, TRX518, dacetuzumab, lucatumumab, SEQ-CD40, CP-870, CP-893, MED16469, MEDI4736, MOXR0916, AMP-224 y MSB001078C o es un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

15 En algunas divulgaciones, los métodos proporcionados incluyen terapia combinada de una terapia celular como se describe e inhibidores de PD-1 o PD-L1. Un inhibidor de PD-1 o PD-L1 puede incluir anticuerpos de unión, antagonistas o inhibidores (es decir, bloqueadores).

20 En una divulgación, el inhibidor de PD-1 es nivolumab (comercializado como OPDIVO de Bristol-Myers Squibb Co.), o biosimilares, fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. Nivolumab es un anticuerpo IgG4 completamente humano que bloquea el receptor de PD-1. En una divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 es una inmunoglobulina G4 kappa, anticuerpo anti-CD274 humano. Nivolumab tiene asignado el número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS) 946414-94-4 y también se conoce como 5C4, BMS-936558, ItIDX-1106 y ONO-4538. La preparación y las propiedades de nivolumab se describen en la patente de EE. UU. N.º 8.008.449 y la publicación de patente internacional N.º WO 2006/121168.

30 En otra divulgación, el inhibidor de PD-1 comprende pembrolizumab (comercializado como KEYTRUDA de Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, EE. UU.), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. Al anticuerpo pembrolizumab se le asigna el número de registro CAS 1374853-91-4 y también se conoce como lambrolizumab, MK-3475 y SCH-900475. Las propiedades, usos y preparación de pembrolizumab se describen en la publicación de patente internacional N.º WO 2008/156712 A1, en la patente de Estados Unidos N.º 8.354.509 y en las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. N.º US 2010/0266617 A1, US 2013/0108651 A1 y US 2013/0109843 A2.

35 En una divulgación, el inhibidor de PD-L1 es durvalumab, también conocido como MEDI4736 (que está comercializado por Medimmune, LLC, Gaithersburg, Maryland, una filial de AstraZeneca plc.), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. En una divulgación, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo divulgado en la patente de EE. UU. N.º 8.779.108 o en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2013/0034559.

40 En una divulgación, el inhibidor de PD-L1 es avelumab, también conocido como MSB0010718C (comercializado por Merck KGaA/EMD Serono), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. La preparación y las propiedades de avelumab se describen en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º US 2014/0341917 A1.

45 En una divulgación, el inhibidor de PD-L1 es atezolizumab, también conocido como MPDL3280A o RG7446 (comercializado por Genentech, Inc., una filial de Roche Holding AG, Basilea, Suiza), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. En una divulgación, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo divulgado en la patente de EE. UU. N.º 8.217.149. En una divulgación, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo divulgado en las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2010/0203056 A1, 2013/0045200 A1, 2013/0045201 A1, 2013/0045202 A1 o 2014/0065135 A1. La preparación y propiedades del atezolizumab se describen en la patente de EE. UU. N.º 8.217.149.

55 II. Definiciones

A menos que se definan de otra manera, se pretende que todos los términos de la técnica, las notaciones y otros términos o terminología técnicos y científicos utilizados en el presente documento tengan el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la materia objeto reivindicada. En algunos casos, los términos con significados comúnmente comprendidos se definen en el presente documento con fines de claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no se ha de considerar necesariamente como representativa de una diferencia sustancial frente a lo que se comprende en la materia.

65 Como se utilizan en el presente documento, las formas singulares "un/uno", "una", y "el" o "la", incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, "un" o "una" significa "al menos uno" o "uno o más". Se entiende que aspectos y variaciones descritas en el presente documento incluyen "que consiste" y/o

"que consiste esencialmente en" aspectos y variaciones.

A lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos del tema reivindicado se presentan en un formato de intervalo. Ha de comprenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la materia objeto reivindicada. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor afirmado o que interviene en el intervalo comentado queda englobado dentro de la materia objeto reivindicada. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse de manera independiente en los intervalos más pequeños, y también están englobados dentro de la materia objeto reivindicada, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o ambos de los límites incluidos también quedan englobados en la materia objeto reivindicada. Esto es aplicable de manera independiente de la amplitud del intervalo.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor correspondiente, fácilmente conocido por los expertos en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

El término "epítopo" significa un péptido corto derivado de un antígeno proteico, en donde el péptido se une a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y es reconocido en el contexto unido al MHC por un linfocito T. El epítopo puede unirse a una molécula del MHC de clase I (por ejemplo, HLA-A1, HLA-A2 o HLA-A3) o a una molécula del MHC de clase II.

El término "alogénico", tal como se utiliza en el presente documento, significa una célula o tejido que se extrae de un organismo y luego se infunde o se transfiere de forma adoptiva a un organismo genéticamente diferente de la misma especie.

El término "autólogo", tal como se utiliza en el presente documento, significa una célula o tejido que se extrae del mismo organismo al que posteriormente se infunde o se transfiere de forma adoptiva.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, incluyendo anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos funcionales (de unión a antígeno), incluyendo fragmentos de unión a antígeno (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), fragmentos de anticuerpos monocatenarios, incluyendo fragmentos variables de cadena única (scFv) y anticuerpos de dominio único (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpo). El término abarca formas de inmunoglobulinas modificadas genéticamente y/o de otro modo, tales como intracuerpos, pepticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos multiespecíficos, p. ej., biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "anticuerpo" abarca fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo. El término también incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, incluyendo anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluyendo IgG y sus subclases, IgM, IgE, IgA e IgD. Entre los anticuerpos proporcionados se encuentran fragmentos de anticuerpos.

Un "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo convencional o intacto que comprende una porción de un anticuerpo convencional o intacto que contiene al menos una región variable que se une a un antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fv de cadena única (sdFv), Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; anticuerpos de dominio único que comprenden solo la región V_H (VHH).

Como se utilizan en el presente documento, "unión", "unido" o variaciones gramaticales de los mismos se refiere a la participación de una molécula en cualquier interacción atractiva con otra molécula, dando como resultado una asociación estable en la que las dos moléculas están muy próximas entre sí. La unión incluye, pero no se limita a, enlaces no covalentes, enlaces covalentes (tales como enlaces covalentes reversibles e irreversibles), e incluye interacciones entre moléculas tales como, pero sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos y moléculas pequeñas, tales como compuestos químicos, incluidos los fármacos.

La expresión "muestra biológica" significa una cantidad de una sustancia de un ser vivo o un antiguo ser vivo. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, (por ejemplo, sangre completa), plasma, suero, orina, líquido amniótico, líquido sinovial, células endoteliales, leucocitos, monocitos, otras células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

Como se utilizan en el presente documento, "enriquecido" cuando se refiere a uno o más tipos de células o poblaciones de células particulares, se refiere a aumentar el número o porcentaje del tipo de célula o población, p. ej., en

comparación con el número total de células o el volumen de la composición, o en relación con otros tipos de células, tal como mediante selección positiva basada en marcadores expresados por la población o célula, o mediante selección negativa basada en un marcador no presente en la población celular o célula que se va a agotar. El término no requiere la eliminación completa de otras células, tipo de célula, o poblaciones de la composición y no requiere que las células así enriquecidas estén presentes en o incluso cerca del 100 % en la composición enriquecida.

La expresión "al mismo tiempo" se utiliza en el presente documento para referirse a un procedimiento, tal como una incubación, selección, enriquecimiento o administración, que implica a dos o más agentes, donde al menos parte del procedimiento particular con un agente se superpone en el tiempo con al menos un segundo agente.

El término "intermitentemente" se utiliza en el presente documento para referirse a un procedimiento, tal como una incubación, selección, enriquecimiento o administración, que implica a dos o más agentes, cuando los procedimientos particulares que implican a cada agente no ocurren a intervalos regulares o no son continuos o se detienen y comienzan repetidamente con períodos intermedios.

El término "secuencialmente" se utiliza en el presente documento para referirse a un procedimiento, tal como una incubación, selección, enriquecimiento o administración, que implica a dos o más agentes, donde el procedimiento particular que implica a cada agente no se superpone en el tiempo.

Como se utilizan en el presente documento, "aislado" o "purificado con referencia a un péptido, proteína o polipéptido" se refiere a una molécula que está sustancialmente exenta de todos los demás polipéptidos, contaminantes, reactivos de partida u otros materiales, o sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Se puede determinar que las preparaciones están sustancialmente exentas si parecen exentas de impurezas fácilmente detectables según lo determinado por métodos de análisis estándar, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC) o electroforesis capilar (CE), usados por los expertos en la materia para evaluar dicha pureza, o suficiente pureza como para que una purificación adicional no altere de manera detectable las propiedades físicas o químicas.

Como se utiliza en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a una célula, microorganismo, molécula de ácido nucleico o vector que ha sido modificado mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico exógena, tal como una heteróloga, o se refiere a una célula o microorganismo que ha sido alterado de manera que se controla la expresión de una molécula de ácido nucleico o gen endógeno, se desregula o es constitutiva, cuando dichas alteraciones o modificaciones puedan ser introducidas mediante ingeniería genética. Las alteraciones genéticas pueden incluir, por ejemplo, modificaciones que introducen moléculas de ácido nucleico (que pueden incluir un elemento de control de la expresión, tal como un promotor) que codifica una o más proteínas o enzimas, u otras adiciones de moléculas de ácido nucleico, deleciones, sustituciones u otras alteraciones funcionales o adiciones al material genético de una célula. Las modificaciones de ejemplo incluyen aquellas en regiones codificantes o fragmentos funcionales de las mismas de polipéptidos heterólogos u homólogos de una molécula parental o de referencia. El término "recombinante" también puede referirse a un producto proteico expresado a partir de dicha molécula de ácido nucleico o vector o de dicha célula o microorganismo en el que se introduce o modifica con un ácido nucleico exógeno.

Como se utiliza en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluyendo células. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuoso, no acuoso o cualquier combinación de los mismos.

Como se utilizan en el presente documento, "opcional" u "opcionalmente" significa que el acontecimiento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto mamífero, frecuentemente un ser humano. Una composición farmacéutica normalmente comprende una cantidad eficaz de un agente activo (p. ej., células, tales como las expandidas de acuerdo con los métodos proporcionados) y un transportador, excipiente o diluyente. El transportador, excipiente o diluyente es normalmente un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, respectivamente.

Un "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un sólido no tóxico, carga semisólida o líquida, diluyente, material de encapsulación, auxiliar de formulación o transportador convencional en la técnica para usar con un agente terapéutico que juntos comprenden una "composición farmacéutica" para administración a un sujeto. Un transportador farmacéuticamente aceptable es no tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El transportador farmacéuticamente aceptable es adecuado para la formulación empleada.

La referencia a "población de células" en el presente documento pretende referirse a una serie de células que comparten un rasgo común. Una población de células generalmente contiene una pluralidad de células, tal como más

de o aproximadamente 100 células, de o aproximadamente 1000 células y normalmente varían de 1×10^4 a 1×10^{10} en número.

5 El término "soluble" como se usa en el presente documento en referencia a proteínas, significa que la proteína no está unida, inmovilizada o adherida a una partícula, tal como una célula o soporte sólido, por ejemplo, una cuenta. Por ejemplo, una proteína soluble incluye una proteína que no está unida como una proteína transmembrana a la membrana celular de una célula. En algunos casos, la solubilidad de una proteína puede mejorarse mediante enlace o unión, directa o indirectamente a través de un enlazador, a otra molécula tal como un dominio Fc, lo que, en algunos casos, también puede mejorar la estabilidad y/o la semivida de la proteína. En algunos aspectos, una proteína soluble es una proteína de fusión Fc.

15 La expresión "se une específicamente" como se usa en el presente documento significa la capacidad de una proteína, en condiciones de unión específicas, para unirse a una proteína diana de modo que su afinidad o avidéz sea al menos 10 veces superior, pero opcionalmente 50, 100, 250 o 500 veces superior, o incluso al menos 1000 veces superior a la afinidad o avidéz promedio de la misma proteína hacia una colección de péptidos o polipéptidos aleatorios de tamaño estadístico suficiente. Una proteína que se une específicamente no necesita unirse exclusivamente a una única molécula diana, sino que puede unirse específicamente a más de una molécula diana. En algunos casos, una proteína de unión específica puede unirse a una proteína que tiene similitud en conformación estructural con la proteína diana (por ejemplo, parálogos u ortólogos). Los expertos reconocerán que la unión específica a una molécula que tiene la misma función en una especie diferente de animal (es decir, ortólogo) o a una molécula que tiene un epítipo sustancialmente similar al de la molécula diana (por ejemplo, parálogo) es posible y no perjudica la especificidad de unión determinada con respecto a una colección estadísticamente válida de no dianas únicas (por ejemplo, polipéptidos aleatorios). Los inmunoensayos ELISA en fase sólida, las mediciones de ForteBio Octet o Biacore se pueden utilizar para determinar la unión específica entre dos proteínas. Generalmente, las interacciones entre dos proteínas de unión tienen constantes de disociación (Kd) menores de aproximadamente 1×10^{-5} M, y frecuentemente de tan solo como aproximadamente 1×10^{-12} M. En ciertos aspectos de la presente divulgación, las interacciones entre dos proteínas de unión tienen constantes de disociación inferiores a aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M o 1×10^{-11} M o menos.

30 Como se utiliza en el presente documento, una declaración de que una célula o población de células es "positiva" para un marcador en particular se refiere a la presencia detectable en la célula de un marcador en particular, normalmente un marcador de superficie. Al referirse a un marcador de superficie, el término se refiere a la presencia de expresión superficial detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en el que la tinción es detectable por citometría de flujo a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada llevando a cabo el mismo procedimiento con un control de isotipo coincidente en condiciones por lo demás idénticas y/o en un nivel sustancialmente similar al de la célula que se sabe que es positiva para el marcador y/o en un nivel sustancialmente superior al de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

40 Como se utiliza en el presente documento, una declaración de que una célula o población de células es "negativa" para un marcador en particular se refiere a la ausencia de presencia sustancial detectable sobre o dentro de la célula de un marcador en particular, normalmente un marcador de superficie. Al referirse a un marcador de superficie, el término se refiere a la ausencia de expresión superficial detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción no es detectada por citometría de flujo a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada llevando a cabo el mismo procedimiento con un control de isotipo emparejado bajo condiciones idénticas por lo demás, y/o en un nivel sustancialmente menor que el de la célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o en un nivel sustancialmente similar en comparación con el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

50 Como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" es un mamífero, tal como un ser humano u otro animal, y normalmente es un ser humano. El sujeto puede ser hombre o mujer y puede tener cualquier edad adecuada, incluyendo bebés, jóvenes, adolescentes, adultos y sujetos geriátricos.

55 Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad y/o concentración de una composición terapéutica, tal como la que contiene células, por ejemplo, expandidas de acuerdo con los métodos proporcionados, que cuando se administra a un paciente actúa de cualquier forma de modo que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, mejoran o se alteran de otra manera beneficiosa. Una cantidad eficaz para tratar una enfermedad o trastorno puede ser una cantidad que mitigue, disminuya o alivie al menos un síntoma o respuesta biológica o efecto asociado con la enfermedad o trastorno, prevenga la progresión de la enfermedad o trastorno, o mejore el funcionamiento físico del paciente. En aspectos particulares, existe una inhibición estadísticamente significativa de la progresión de la enfermedad, por ejemplo, mejorando o eliminando los síntomas y/o la causa de la enfermedad. En el caso de la terapia celular, la cantidad eficaz es una dosis eficaz o número de células administradas a un paciente. En algunas realizaciones, el paciente es un paciente humano.

65 Como se utilizan en el presente documento, "enfermedad", "trastorno" o "afección" se refiere a una afección patológica en un organismo que resulta de una causa o afección que incluye, pero sin limitación, infecciones, afecciones

adquiridas, afecciones genéticas y caracterizadas por síntomas identificables. En particular, es una afección donde se necesita y/o se desea tratamiento.

5 Los términos "tratar", "tratamiento", o "terapia" de una enfermedad o trastorno como se utilizan en el presente documento significan desaceleración, detención o reversión de la progresión de la enfermedad o los trastornos, como lo demuestra la disminución, cese o eliminación de los síntomas clínicos o diagnósticos, mediante la administración de una proteína inmunomoduladora o células modificadas genéticamente descritas en el presente documento, ya sea solas o en combinación con otro compuesto como se describe en el presente documento. "Que trata", "tratamiento", o "terapia" también significa una disminución de la gravedad de los síntomas en una enfermedad o trastorno agudo o crónico o una disminución de la tasa de recaída como por ejemplo en el caso del transcurso de una enfermedad autoinmunitaria recurrente o remitente o una disminución de la inflamación en el caso de un aspecto inflamatorio de una enfermedad autoinmunitaria. "Que previene", "profilaxis", o "prevención" de una enfermedad o trastorno como se usa en el contexto de esta divulgación se refiere a la administración de una proteína inmunomoduladora o células modificadas genéticamente que expresan una proteína inmunomoduladora de la presente divulgación, ya sea sola o combinada con otro compuesto, para prevenir la presencia o aparición de una enfermedad o trastorno o algunos o todos los síntomas de una enfermedad o trastorno o para disminuir la probabilidad de la aparición de una enfermedad o trastorno. Por ejemplo, en el contexto del cáncer, los términos "tratamiento" o, "inhibir", "que inhibe" o "inhibición" del cáncer se refiere al menos a uno de: una disminución estadísticamente significativa en la tasa de crecimiento tumoral, un cese del crecimiento del tumor, o una reducción del tamaño, masa, actividad metabólica, o volumen del tumor, medido por criterios estándar tales como, pero sin limitación, los Criterios de evaluación de respuesta para tumores sólidos (RECIST), o un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia libre de progresión (SSP) o la supervivencia global (SG).

25 El término "antígeno" se refiere a una molécula que puede inducir una respuesta inmunitaria. Habitualmente, un antígeno es una molécula que es capaz de unirse mediante un sitio de reconocimiento en una molécula inmunitaria, tal como un anticuerpo o un receptor de linfocitos T si se presenta mediante moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Un antígeno puede tener uno o más epítopos en los que cada epítopo que forma parte del antígeno puede unirse mediante un sitio de reconocimiento de un anticuerpo o complejo TCR/MHC. En algunas realizaciones, un antígeno es capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral o una respuesta inmunitaria celular que conduce a la activación de los linfocitos B y/o de los linfocitos T.

Como se utilizan en el presente documento, un "antígeno asociado a tumores" o "antígeno específico de tumores" se refiere a una proteína u otra molécula que se encuentra solo en las células cancerosas y no en las células normales.

35 Como se utilizan en el presente documento, "neoantígeno" se refiere a un antígeno al que el sistema inmunitario no ha estado expuesto previamente, tal como el que surge por alteración de los antígenos del hospedador por infección viral, transformación neoplásica, metabolismo de fármacos o de otra manera. En aspectos particulares, un neoantígeno es un antígeno codificado por genes mutados específicos de un tumor o que es un antígeno nuevo que se desarrolla en una célula tumoral.

40 La expresión "*in vivo*" se refiere a un acontecimiento que tiene lugar en el cuerpo de un sujeto.

45 La expresión "*ex vivo*" se refiere a un acontecimiento que tiene lugar en o dentro de un tejido o células de un sujeto mamífero pero fuera del cuerpo del sujeto mamífero. Normalmente el acontecimiento se lleva a cabo en un entorno externo. En aspectos particulares, un procedimiento *ex vivo* incluye cualquiera en el que se toma un órgano, célula o tejido de un sujeto, normalmente un cuerpo vivo, para un tratamiento o procedimiento y luego devuelve al sujeto.

50 La expresión "*in vitro*" se refiere a un acontecimiento que tiene lugar en un sistema de prueba, tal como en un laboratorio.

Como se utiliza en el presente documento, un kit es una combinación envasada que opcionalmente incluye otros elementos, tales como reactivos adicionales e instrucciones de uso de la combinación o elementos de la misma.

55 El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

60 Como se utilizan en el presente documento, un "artículo manufacturado" es un producto que se fabrica y, en algunos casos, que se puede vender. En algunas realizaciones, la expresión se puede referir a composiciones contenidas en artículos de envasado, tal como en un recipiente.

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste", y "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

65

III. Ejemplos

Los ejemplos siguientes se incluyen con fines ilustrativos únicamente y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

5 **Ejemplo 1 Evaluación de metodologías de procesamiento de tumores en la obtención de una población de linfocitos T derivados de tumores**

10 Los tumores de pacientes con cáncer colorrectal (CRC) o melanoma se procesaron como se describe a continuación y las poblaciones de linfocitos T infiltrantes resultantes se analizaron para determinar la viabilidad del recuento de células.

A. Cáncer colorrectal

15 Los tumores se obtuvieron de tumores primarios de pacientes con cáncer colorrectal y se enviaron durante la noche en HypoThermosol a 4 °C. Los tumores se procesaron como cultivos de fragmentos o de suspensión de células individuales (SCS).

20 Para los cultivos de fragmentos, los tumores se trituraron en fragmentos de 1 - 8 mm de diámetro y cada fragmento de 1 - 8 mm se colocó en un pocillo de un recipiente de cultivo, ya sea una placa de cultivo de 24 pocillos permeable a los gases o una placa convencional de 6 pocillos, en presencia de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) que contiene un 5 % de suero humano o medio OpTmizer sin suero (ThermoFisher). El medio se complementó con 300 o 6000 UI/ml de IL-2 recombinante y también contenía gentamicina a 10 µg/ml, reemplazo de suero de células inmunitarias (ThermoFisher) entre 2 y 5 % de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y una concentración final de 2,0 mM de una forma dipéptido de glutamina L-alanil-L-glutamina (Suplemento GlutaMAX; ThermoFisher). Los cultivos de fragmentos se mantuvieron y controlaron visualmente hasta que se obtuvo un recuento celular entre 25 aproximadamente el día 5 y 11 de cultivo.

30 Para los cultivos SCS, los tumores también se cortaron en fragmentos de 1 - 8 mm de diámetro. A continuación, los fragmentos se homogeneizaron en un sistema cerrado utilizando Miltenyi GentleMACS en presencia o ausencia de una enzima para digerir el tumor, ya sea un cóctel de enzimas del kit de disociación de tumores Miltenyi, humano (parte 130-095-929) utilizado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, mezcla de colagenasa I/II (Nordmark, Collagenase NB 4G Proved Grade, parte: S 1746503) o colagenasa IV (Worthington Biomedical parte: LS004130) a 1 mg/ml o 5 mg/ml. Los fragmentos designados para SCS con homogeneización y digestión enzimática se incubaron con el cóctel de enzimas o colagenasa durante un total de 60 minutos. Inmediatamente después de la 35 generación de la SCS, los recuentos celulares y las evaluaciones de viabilidad se realizaron en el contador celular automatizado NC-200 (ChemoMetec).

40 Como se muestra en la **Figura 3A**, los cultivos de SCS con o sin digestión enzimática produjeron más células viables totales (TVC) que las obtenidas después del cultivo de fragmentos de tumores de CRC. En la **Figura 3B** se representa el porcentaje de células viables que fue similar en cultivos generados a partir de fragmentos o SCS generados por homogeneización en presencia de enzimas.

B. Melanoma

45 Los tumores se obtuvieron de tumores primarios en pacientes con melanoma y se enviaron durante la noche en HypoThermosol a 4 °C. Las células se cultivaron de manera similar a la descrita anteriormente.

50 Brevemente, para cultivos de fragmentos, los tumores se trituraron en fragmentos de 1 - 8 mm de diámetro, y cada fragmento de 1 - 8 mm se cultivó en un pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos permeable a los gases o en una placa convencional de 6 pocillos en presencia de RPMI que contenía 5 % de suero humano o medio OpTmizer sin suero suplementado con IL-2 recombinante a una concentración de 300 UI/ml o 6000 UI/ml. Los medios también contenían gentamicina a 10 µg/ml y una concentración final de 2,0 mM de una forma dipéptido de glutamina L-alanil-L-glutamina (Suplemento GlutaMAX; ThermoFisher). Los cultivos de fragmentos se mantuvieron y controlaron 55 visualmente hasta que se obtuvo un recuento celular entre los días 5 y 9 de cultivo.

60 Para generar cultivos SCS, los fragmentos de tumor se homogeneizaron utilizando Miltenyi GentleMACS en presencia o ausencia de una enzima, que incluía colagenasa IV a una concentración de 1 mg/ml o 5 mg/ml o una mezcla de colagenasa I/II a 1 mg/ml o 5 mg/ml (Nordmark, Collagenase NB 4G Proved Grade, parte: S1746503). Como anteriormente, las evaluaciones de viabilidad y recuento de células se realizaron inmediatamente después de la generación de SCS utilizando el contador de células automatizado NC-200 (Chemometec).

65 En la **Figura 4A** se representan los cultivos generados a partir de fragmentos de tumores de melanoma que produjeron más células viables totales que las SCS generadas mediante homogeneización y disociación con enzimas. Como se muestra en la **Figura 4B**, los cultivos de fragmentos también tenían un mayor porcentaje de células viables que las células en cultivos SCS, independientemente de la homogeneización enzimática.

Ejemplo 2 Evaluación de la cinética de expansión de linfocitos T de células derivadas de tumores

Los tumores se procesaron como se describe en el Ejemplo 1 para generar fragmentos de 1 - 8 mm de diámetro o cultivos SCS, que luego se incubaron en condiciones para expandir las poblaciones de linfocitos T presentes dentro del tumor. Los cultivos se cultivaron en diversas condiciones probadas en presencia de IL-2 recombinante como se describe a continuación para evaluar la expansión celular. Entre las condiciones que se probaron estuvieron el efecto del tipo de placa de cultivo, los medios de cultivo y la concentración de IL-2 en la expansión celular.

A. Condiciones de cultivo

Las suspensiones unicelulares (SCS) obtenidas por homogeneización y digestión enzimática de tumores primarios de pacientes donantes con CRC o melanoma, como se describe en el Ejemplo 1, se cultivaron en una placa de 6 pocillos convencional o en una placa de cultivo de 24 pocillos permeable a los gases. Cuando fue posible, se iniciaron y promediaron (las barras de error representan \pm desviación estándar) múltiples condiciones de cada donante. Para las placas de 6 pocillos, las células se sembraron entre 250.000 y 1.000.000 células/ml y para las placas de 24 pocillos permeables a los gases, las células se sembraron entre 5.000 y 750.000 células/ml. En ambos casos, las células se sembraron en RPMI que contenía suero humano al 5 % o en medio OpTmizer sin suero con IL-2 recombinante suplementado con una concentración de IL-2 de 300 UI/ml o 6000 UI/ml. Los medios también contenían gentamicina a 10 μ g/ml y una concentración final de 2,0 mM de una forma dipéptido de glutamina L-alanil-L-glutamina (Suplemento GlutaMAX; Thermofisher). Las células se incubaron durante un período de hasta 31 días, normalmente de 14 a 21 días, en donde el 50 % del medio celular se intercambiaba cada dos días a partir del quinto día de cultivo.

Para la expansión de fragmentos de tumores, un fragmento de tumor individual de 1 - 8 mm, obtenido como se describe en el Ejemplo 1 a partir de tumores primarios de pacientes donantes con CRC o melanoma, se colocó en un pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos permeable a los gases o en una placa de 6 pocillos, y se cultivó en RPMI que contenía suero humano al 5 % o en medio OpTmizer sin suero con IL-2 recombinante suplementado a una concentración de 300 UI/ml o 6000 UI/ml. Los medios también contenían gentamicina a 10 μ g/ml y una concentración final de 2,0 mM de una forma dipéptido de glutamina L-alanil-L-glutamina (Suplemento GlutaMAX; Thermofisher). Las células se incubaron durante un período de hasta 31 días, tal como normalmente de 14 a 21 días, en donde el 50 % del medio celular se intercambiaba cada dos días a partir del quinto día de cultivo.

Para todas las condiciones, los recuentos de células se realizaron aproximadamente cada dos días utilizando el contador de células automatizado NC-200 (Chemometec) y se recogieron muestras para la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Después de completar la fase de expansión (por ejemplo, días 14 - 31), las células se lavaron en PBS y luego se crioconservaron en presencia de un crioprotector. La crioconservación se llevó a cabo utilizando dispositivos CoolCell (Corning) o VIA Freeze (GE Healthcare).

B. Resultados**1. Curvas de crecimiento**

Las curvas de crecimiento de expansión de SCS obtenidas de fragmentos de tumor de pacientes donantes de CRC después de un cultivo de expansión en diferentes recipientes de cultivo se muestran en las **Figuras 5A y 5B**. Los resultados mostrados provienen de cultivos incubados con IL-2 recombinante en concentraciones de 300 UI/ml o 6000 UI/ml, y en cualquier tipo de medio, pero separados según la fuente de las células iniciales. Como se muestra, en estas condiciones fue posible expandir células derivadas de tumores a partir de SCS de tumores de donantes de CRC. En algunos donantes se observó una expansión mayor de 2 veces e incluso de hasta 10 veces o más en esta fase de expansión inicial de células obtenidas directamente de tumores CRC.

Se evaluó la expansión lograda a partir de SCS en comparación con los fragmentos de tumor de los productos de biopsia de tumores CRC. Como se muestra en las **Figuras 5C y 5D**, fue posible expandir células de tumores de CRC en estas condiciones, ya sea que se extrajeran y se cultivaran como fragmentos o como SCS. Sin embargo, en general, se logró una mayor expansión en cultivos de CRC extraídos como SCS, como lo demuestra el mayor número total de células (**Figura 5C**) y el factor de expansión (**Figura 5D**) en comparación con el cultivo de células extraídas mediante fragmentos.

Las curvas de crecimiento de expansión de células cultivadas como fragmentos de tumor extraídos o como SCS de fragmentos de tumor, de diferentes donantes de melanoma después del cultivo de expansión en diferentes recipientes de cultivo se muestran en las **Figuras 6A y 6B**. Los resultados mostrados provienen de cultivos incubados con IL-2 recombinante en concentraciones de 300 UI/ml o 6000 UI/ml, y en cualquier tipo de medio, pero separados según la fuente de las células iniciales. Como se muestra, se observó una expansión sustancial en cultivos de melanoma extraídos como fragmentos de tumor en cualquiera de los recipientes de cultivo, mientras que se observó una menor expansión para las células de melanoma cultivadas como SCS.

De acuerdo con las observaciones anteriores, las células tumorales de ciertos donantes no eran susceptibles de expansión, independientemente del tipo de tumor, lo que es indicativo de la variabilidad inherente en el potencial de expansión entre donantes y, además, entre fragmentos de tumor del mismo tumor donante. Se esperaría que los métodos a mayor escala en los que se combinan fragmentos de tumor de un paciente donante durante el cultivo mitiguen la variabilidad intratumoral al combinar fragmentos de tumor del mismo tumor donante.

2. Evaluación del crecimiento por medios celulares

Los cultivos expandidos generados como se ha descrito anteriormente en medios RPMI que contienen 5 % de suero humano o una formulación de reemplazo de suero (medio OpTmizer) se compararon después de la expansión durante entre 14 y 21 días. Los resultados mostrados provienen de cultivos incubados con IL-2 recombinante en concentraciones de 300 UI/ml o 6000 UI/ml, y en cualquier tipo de recipiente de cultivo, pero separados según el tipo de medio. Los resultados de los tumores de CRC provienen del cultivo de SCS obtenidos de fragmentos de tumores (**Figura 7A y 7B**), mientras que los resultados de los tumores de melanoma provienen del cultivo de fragmentos de tumores (**Figura 8A y 8B**).

En ambos tipos de tumores, se observó un aumento en el número total de células (**Figura 7A y Figura 8A**) y en el factor de expansión (**Figura 7B y Figura 8B**) mediante cultivo en suero humano al 5 % o en medios de reemplazo de suero para ambos tipos de tumores. En las muestras analizadas, había una tendencia a mejorar la expansión utilizando los medios OpTmizer, como lo demuestra un mayor número general de células al final de la fase de expansión inicial (**Figura 7A y Figura 8A**).

3. Concentración de IL-2

Se comparó el efecto de diferentes concentraciones de IL-2 durante las expansiones de los diferentes tipos de tumores. Los cultivos se expandieron como se ha descrito anteriormente en medio RPMI que contenía 5 % de suero humano o una formulación de reemplazo de suero (medio OpTmizer) durante entre 14 y 21 días, en 300 UI/ml o 6000 UI/ml de IL-2 recombinante. Los resultados mostrados provienen de cultivos incubados en presencia de cualquier tipo de medio y en cualquier tipo de recipiente de cultivo, pero separados por la concentración de IL-2. Los resultados de los tumores de CRC provienen del cultivo de SCS obtenidos de fragmentos de tumores (**Figura 9A y 9B**), mientras que los resultados de los tumores de melanoma provienen del cultivo de fragmentos de tumores (**Figura 10A y 10B**).

En ambos tipos de tumores, los resultados mostraron una expansión similar de las células cultivadas en una concentración alta o baja de IL-2, como lo demuestra un número total de células similar después de la expansión (**Figura 9A y Figura 10A**), así como el factor de expansión (**Figura 9B y Figura 10B**). Estos datos respaldan la observación de que dosis de IL-2 de aproximadamente 300 UI/ml favorecen la expansión, y que una dosis alta de IL-2, tal como 6000 UI/ml, no es necesaria para la expansión celular ni en cultivos de CRC ni de melanoma.

Conjuntamente, los resultados muestran que si bien la expansión puede ser dependiente del donante y además, dependiente de la muestra del tumor, los linfocitos T infiltrantes de tumores CRC se cultivaron con éxito a partir de cultivos de SCS y los linfocitos T infiltrantes de melanoma a partir de cultivos de fragmentos de múltiples donantes. De manera similar, se observó que tanto para los cultivos de linfocitos T derivados de melanoma como de CRC, la adición de altas concentraciones de IL-2 no dio como resultado una respuesta de expansión apreciablemente distinta en comparación con una dosis más baja.

Ejemplo 3 Evaluación de la estimulación anti-CD3 sobre la expansión de células derivadas de tumores

Se cultivaron células procesadas a partir de fragmentos de tumor de melanoma como se describe en los Ejemplos 1 y 2, en presencia o ausencia de 50 ng/ml de OKT3, un anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano. Los cultivos celulares se llevaron a cabo entre 14 y 31 días en una placa de 6 pocillos convencional o en una placa de cultivo permeable a los gases con medio RPMI u OpTmizer. Los cultivos también se suplementaron con 300 o 6000 UI/ml de IL-2 recombinante, 10 µg/ml de gentamicina y una concentración final de 2,0 mM de una forma dipéptido de glutamina L-alanil-L-glutamina (Suplemento GlutaMAX; ThermoFisher). Aproximadamente el 50 % del medio celular se intercambiaba cada dos días a partir del quinto día de cultivo como se ha descrito anteriormente. A continuación, se contaron las células utilizando el contador de células automatizado NC-200 (Chemometec).

Los resultados mostrados provienen de cultivos incubados con IL-2 recombinante en concentraciones de 300 UI/ml o 6000 UI/ml, diferentes medios, y en cualquier tipo de recipiente de cultivo, pero separados según la presencia o ausencia de estimulación anti-CD3. Las células del donante 6 se analizaron tanto en presencia como en ausencia de estimulación anti-CD3, y demostraron una expansión de 2 a 4 veces en todas las condiciones, observándose una expansión de 13 veces en medio OpTmizer suplementado con 300 UI/ml de IL-2 con incubación en ausencia de estimulación anti-CD3 (-OKT3). Los resultados mostrados en las **Figuras 11A-11B** demuestran que la estimulación de CD3 a través de OKT3 apoyó la expansión de los linfocitos T, pero no afectó sustancialmente al número total de células (**Figura 11A**) o el factor de expansión (**Figura 11B**). Estos datos concuerdan con el hallazgo de que la estimulación anti-CD3 (por ejemplo, mediante OKT3) puede no ser necesaria para la expansión de células de cultivos tumorales.

Ejemplo 4 Evaluación de marcadores de activación CD4+ y CD8+ post-estimulación

Se descongelaron linfocitos T de tres donantes sanos, se dejaron en reposo durante la noche en medio OpTmizer suplementado con 300 UI/ml de IL-2 recombinante, y luego se activó usando 50 ng/ml de OKT3, un anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano. Se midieron marcadores específicos de activación en las poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ mediante citometría de flujo durante un período de 3 a 48 horas. De manera específica, se evaluaron los siguientes marcadores: CD38 y CD39 (**Figura 12A y Figura 13A**), CD134 y CD137 (**Figura 12B y Figura 13B**), y CD69 y CD90 (**Figura 12C y Figura 13C**).

Los resultados de la expresión de marcadores de activación en la superficie de los linfocitos CD8 se muestran en las **Figuras 12A-12C**, lo que demuestra la cinética de regulación positiva de marcadores en linfocitos T CD8+ en las 48 horas posteriores a la estimulación con OKT3 en comparación con el cultivo en ausencia de OKT3. En algunos casos, se puede observar algún nivel basal de los marcadores el día 0 antes de la estimulación. Como se muestra, todos los marcadores evaluados estuvieron regulados positivamente hasta cierto punto durante este transcurso de tiempo, con el mayor porcentaje de células reguladas positivamente para los marcadores CD38 (**Figura 12A**), CD134 (**Figura 12B**) y CD69 (**Figura 12C**) durante este estudio.

Los resultados de la expresión de marcadores de activación en la superficie de los linfocitos CD4 se muestran en las **Figuras 13A-13C**, que demuestra la cinética de regulación positiva de marcadores en linfocitos T CD4+ en las primeras 48 horas después de la estimulación con OKT3 en comparación con el cultivo en ausencia de OKT3. Como se muestra, todos los marcadores evaluados estuvieron regulados positivamente hasta cierto punto durante este transcurso de tiempo, con el mayor porcentaje de células reguladas positivamente para los marcadores CD38 (**Figura 13A**), CD137 (**Figura 13B**) y CD69 (**Figura 13C**) durante este estudio.

En conjunto, estos datos respaldan que la expresión de los marcadores anteriores se puede utilizar como marcadores de regulación positiva para seleccionar linfocitos T que se han activado, incluso en condiciones de activación que se esperaría que estimularan la señalización a través del complejo TCR-CD3 como ocurriría después del cocultivo con células presentadoras de antígeno que presentan péptidos neoantigénicos.

Ejemplo 5 Determinación del fenotipo de la célula donante y la viabilidad celular

Los linfocitos T se obtuvieron de tumores primarios en pacientes con melanoma o CRC como se describe en el Ejemplo 1. Las células de los tumores se extrajeron como fragmentos de tumor o como SCS como se describe en el Ejemplo 1, y luego se evaluó el fenotipo de los linfocitos T mediante citometría de flujo.

Para fragmentos de tumores, cada fragmento de 1 - 8 mm se colocó en un pocillo de un recipiente de cultivo, ya sea una placa de cultivo de 24 pocillos permeable a los gases o una placa convencional de 6 pocillos, y se incubaron durante entre 5 y 11 días en presencia de RPMI que contenía un 5 % de suero humano o medio OpTmizer sin suero (ThermoFisher). El medio se complementó con 300 o 6000 UI/ml de IL-2 recombinante y también contenía gentamicina a 10 µg/ml y una concentración final de 2,0 mM de una forma dipéptido de glutamina L-alanil-L-glutamina (Suplemento GlutaMAX; Thermofisher). La incubación también se llevó a cabo con o sin 50 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 OKT3. Los cultivos de fragmentos se controlaron visualmente hasta que se determinó que se podía realizar un recuento de células (normalmente entre los días 5 y 9 de cultivo) y luego las células se tiñeron y se analizaron mediante citometría de flujo para detectar marcadores de linfocitos T.

Como alternativa, para los cultivos SCS, los tumores se trituraron en fragmentos de 1 - 8 mm de diámetro, a continuación se homogeneizaron en presencia o ausencia de colagenasa IV (Worthington Biomedical parte: LS004130) a 1 mg/ml o 5 mg/ml o Collagenase NB4G Proved Grade (Nordmark Biomedicals; N.º de catálogo S1746503) a 1 mg/ml. Después de la incubación con enzima durante unos 90 minutos, las células se tiñeron inmediatamente y se analizaron mediante citometría de flujo en busca de marcadores de linfocitos T.

Las jerarquías de acotamiento se diseñaron de la siguiente manera: en primer lugar, se registró el porcentaje de linfocitos CD3+ de una población original del total de acontecimientos celulares, seguido por el porcentaje de linfocitos CD4+ viables de las poblaciones originales de CD3+ y luego por el porcentaje de linfocitos CD8+ viables de la misma población CD3+ original. A continuación se calcularon las poblaciones de linfocitos T de memoria (Tem) en función de sus respectivas poblaciones parentales CD4+ y CD8+. Por tanto, CD4/Tem se determinó a partir de la población original de linfocitos CD4+ viables, mientras que CD8/Tem se determinó a partir de las poblaciones originales de linfocitos CD8+ viables. Por tanto, los resultados, como se representa en la **Figura 12**, son el porcentaje de linfocitos CD3+ de una población original del total de acontecimientos celulares registrados, que se clasificaron en una jerarquía en subpoblaciones como porcentaje de la población principal respectiva en la jerarquía. La **Figura 14** representa el porcentaje de células viables positivas para marcadores de linfocitos T seleccionados en suspensiones de células individuales inmediatamente después de la extracción de fragmentos de tumor mediante homogeneización y digestión enzimática de un donante de CRC de ejemplo (donante 1).

El porcentaje de linfocitos CD3 se comparó en muestras de SCS que se habían extraído únicamente mediante homogeneización (sin colagenasa) o mediante homogeneización después de la digestión con una concentración baja de colagenasa (1 mg/ml) o una concentración alta de colagenasa (5 mg/ml). Los resultados de un segundo CRC y un paciente con melanoma se muestran en la **Figura 15A** y **Figura 15B**, respectivamente. Como se muestra en la **Figura 15A**, los resultados demuestran una mayor recuperación de linfocitos T CD3+ en SCS de un donante de CRC después de la homogeneización y digestión con una baja concentración de colagenasa. Aunque el porcentaje de linfocitos CD3+ en SCS provenientes de un donante de melanoma fue menor, los resultados también demuestran que la homogeneización y digestión con una baja concentración de colagenasa produjo el mayor porcentaje de linfocitos T CD3+ (**Figura 15B**). En conjunto, estas observaciones demuestran que se puede lograr una pureza relativamente alta de las células de SCS de tumores de melanoma y pueden respaldar que SCS es una fuente viable de linfocitos CD3+ derivados de melanoma.

También se evaluó el porcentaje de linfocitos CD3+ en SCS extraídas de tumores de un donante de CRC de ejemplo adicional. Además, en este mismo donante, el porcentaje de linfocitos T CD3+ en las SCS inmediatamente después de la homogeneización y digestión se comparó con (1) el porcentaje de linfocitos CD3+ después del cultivo de SCS con 300 UI/ml de IL-2 (baja) o 6000 UI/ml de IL-2 (alta) durante 6 días, o (2) el porcentaje de linfocitos CD3+ después del cultivo de fragmentos de tumor individuales durante hasta 6 días con 300 UI/ml de IL-2 (baja) o 6000 UI/ml (alta) en presencia o ausencia de estimulación CD3 (OKT3). Como se muestra en la **Figura 15C**, el porcentaje de linfocitos CD3 en la SCS inicial (día 0) fue sustancialmente superior al porcentaje de linfocitos CD3+ en cultivos obtenidos después del cultivo de fragmentos de tumor con IL-2 u OKT3 durante 6 días. Se observaron resultados similares del cultivo de fragmentos de tumores de dos donantes adicionales, en el que el porcentaje de linfocitos CD3+ en cultivos obtenidos tras el cultivo de fragmentos de tumor derivados de CRC con IL-2 y/u OKT3 durante 11 días (**Figura 15D**) o 9 días (**Figura 15E**) también mostraron en general un rendimiento bajo al extraer células tumorales de fragmentos de tumores CRC en las diversas condiciones evaluadas. Estos resultados son concordantes con el hallazgo de que las SCS de biopsias tumorales de pacientes con CRC pueden ser más capaces de proporcionar una mayor cantidad de linfocitos T para la expansión que las células obtenidas del cultivo de fragmentos de tumor.

A diferencia de los resultados del cultivo de fragmentos de tumor de pacientes con CRC, la **Figura 16** muestra que se puede obtener un alto porcentaje de linfocitos T CD3+ a partir del cultivo de fragmentos de tumores de melanoma en diversas condiciones, tal como la presencia de concentraciones bajas (300 UI/ml) o altas (6000 UI/ml) de IL-2, la presencia o ausencia de estimulación de CD3 (OKT3) o diferentes medios. Los resultados representados en la **Figura 16** son de un cultivo del Día 0. Estos resultados son concordantes con el hallazgo de que el cultivo de fragmentos de tumor de pacientes con melanoma puede ser más capaz de proporcionar una mayor cantidad de linfocitos T para la expansión que las células obtenidas de SCS de biopsias tumorales.

Ejemplo 6 Cuantificación de la activación de linfocitos T derivadas de tumores después del cocultivo con células presentadoras de antígeno

Los linfocitos T se obtuvieron de tumores primarios en pacientes con melanoma o CRC como fragmentos de tumores, como se describe en el Ejemplo 1. Después de 5 días de cultivo en medio OpTmizer sin suero (ThermoFisher) suplementado con 300 UI/ml de IL-2 recombinante, gentamicina a 10 µg/ml, reemplazo de suero de células inmunitarias (ThermoFisher) entre 2 y 5 % de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y una concentración final de 2,0 mM de una forma dipéptido de glutamina L-alanil-L-glutamina (Suplemento GlutaMAX; ThermoFisher), las células derivadas de tumores se lavaron con medio OpTmizer antes de centrifugarse a 300 x g durante 5 minutos y se suspendieron a 2×10^6 células/ml. A continuación, se sembraron las células en una placa de cultivo convencional de 6 pocillos a razón de 10.000.000 células/pocillo.

En un cultivo paralelo, las células dendríticas (DC) presentadoras de antígeno se diferenciaron de las PBMC obtenidas del mismo paciente (autólogas) que los linfocitos T de origen. Los crioviales de PBMC congeladas aisladas de donantes de aféresis se descongelaron del almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células se descongelaron en un volumen diez veces mayor de 1X DPBS (Gibco) y se contaron (NucleoCounter NC200). Después del lavado, las células se usaron inmediatamente para la selección positiva de microcuentas CD14 (MACS Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del kit del fabricante. Se contaron las células CD14 (monocitos) purificadas, las células se resuspendieron en DendriMAC (MACS Miltenyi) y se sembraron a una densidad de $0,5-2 \times 10^6$ células por ml en el matraz de cultivo apropiado. Se añadieron GM-CSF (100 ng/ml) e IL-4 (20 ng/ml) a los cultivos para promover la diferenciación en células dendríticas inmaduras. Los monocitos se cultivaron y diferenciaron durante un total de 5 días, con una adición del 50 % de medio equivalente al 50 % de la cantidad inicial de medio el día 2.

Las transcripciones codificantes de péptidos específicos de tumores se identificaron de forma autóloga para cada paciente a partir de la secuenciación del exoma completo y la secuenciación del ARN como se describe en Parkhurst, Maria R., *et al.* "Unique neoantigens arise from somatic mutations in patients with gastrointestinal cancers". *Cancer discovery* 9.8 (2019): 1022-1035. La secuenciación del exoma completo (WES) de muestras de pacientes se realizó en tejido tumoral, no fijado, congelado instantáneamente y células sanguíneas periféricas normales (fuente normal). Las alineaciones de secuencias de muestras tumorales frente a muestras normales se realizaron utilizando novoalign MPI de novocraft (<http://www.novocraft.com/>) para la construcción del genoma humano hg19. Los duplicados se marcaron utilizando la herramienta MarkDuplicates de Picard. La realineación de inserción deleción y la recalibración de la base

- se llevaron a cabo de acuerdo con el flujo de trabajo de mejores prácticas de GATK (<https://www.broadinstitute.org/gatk/>). Después de la limpieza de datos, los archivos de acumulación se crearon utilizando samtools mpileup (<http://samtools.sourceforge.net>) and Varscan2, (<http://varscan.sourceforge.net>), SomaticSniper (<http://gmt.genome.wustl.edu/packages/somatic-sniper/>), Strelka (<https://sites.google.com/site/strelkasomaticvariantcaller/>) y Mutect (<https://www.broadinstitute.org/gatk/>). Los archivos VCF se fusionaron utilizando las herramientas GATK CombineVariants y se anotaron utilizando Annovar (<http://annovar.openbioinformatics.org>). Luego se anotaron las variantes (mutaciones) presentes en los tumores de los pacientes utilizando Annovar (<http://annovar.openbioinformatics.org>).
- 10 Se utilizaron los siguientes filtros para generar una lista inicial de supuestas mutaciones para evaluación: (1) un tumor y una cobertura normal superior a 10, (2) una frecuencia alélica variante (VAF) del 7 % o superior, (3) recuentos de lectura variante de 4 o más, (4) y dos de las cuatro consultas para identificar mutaciones. Para inserciones y deleciones, se utilizaron los mismos límites, excepto que solo se requirió una única consulta para identificar la mutación para que pasara los filtros, ya que sólo se consultaba con varscan y strelka. Se generaron tablas de secuencias de aminoácidos correspondientes al resto mutante unido a los 12 aminoácidos codificados por regiones 5' y 3' de variantes de nucleótido único (SNV) (N unidades) para aquellas variantes que pasaron los cuatro filtros. Para transcritos con desplazamiento de marco, las secuencias se tradujeron hasta que se generó un codón de parada en la región codificante normal o en la región 3' no traducida. El Integrative Genomics Viewer (IGV, Broad Institute), que permite visualizar las alineaciones cartografiadas, se utilizó después para llevar a cabo la depuración manual de las consultas de variantes. Se realizaron cambios en las secuencias de N unidades cuando la depuración manual reveló cambios no sinónimos resultantes de variantes somáticas adicionales o variantes de la línea germinal presentes en las transcripciones que codifican las N unidades. Las variantes inferidas de lecturas que contienen múltiples nucleótidos no coincidentes, las inserciones/deleciones cartografiadas en diferentes ubicaciones en diferentes lecturas, y las variantes correspondientes a SNP frecuentes se marcaron para su eliminación.
- 15 20 25
- Las variantes que se detectaron en más de un tumor de pacientes pero en menos del 2,5 % del total de tumores se marcaron pero se incluyeron en la lista de variantes que pasaron. Las transcripciones variantes anotadas únicamente en la base de datos ENSEMBL generalmente representan regiones codificantes no verificadas y también se eliminaron. Las variantes marcadas como polimorfismos conocidos de un solo nucleótido o que estaban presentes en múltiples tumores no se eliminaron automáticamente, sino que se evaluaron más a fondo utilizando IGV, para eliminar posibles falsos positivos, que es poco probable que codifiquen productos reconocidos por los linfocitos T, era menos crítico que eliminar candidatos que pudieran representar falsos negativos.
- 30 35
- Estos datos de secuenciación se utilizaron luego para generar un grupo de péptidos que representa el péptido mutado asociado con el tumor y el péptido de tipo silvestre asociado con células de sangre periférica no afectadas.
- Los péptidos sintéticos se sintetizaron mediante química Fmoc. Para los indeles, se sintetizaron péptidos de 25 aminoácidos superpuestos por 10 aminoácidos basándose en la traducción de la secuencia con marco desplazado hasta el siguiente codón de parada. En algunos casos, se sintetizaron péptidos de epitopos mínimos. Los péptidos se disolvieron en DMSO y se mezclaron en volúmenes iguales.
- 40 45
- Las DC diferenciadas se cargaron con un número y una concentración variables de péptidos de un grupo de péptidos identificados como se ha descrito anteriormente antes de agregarlos al cultivo derivado del tumor en varias proporciones de células tumorales: DC. A continuación, las DC y las células derivadas de tumores se cultivaron conjuntamente a 37 °C durante 6 horas al 5 % de CO₂ antes de que el cultivo se agitara suavemente y se recuperaran las células en suspensión. A continuación, las células recuperadas se clasificaron mediante citometría de flujo para detectar linfocitos T activados utilizando marcadores de activación de linfocitos T 4-1BB y OX40.
- 50 55
- La **Figura 17A y 17B** muestran la activación de linfocitos T derivados de tumores en un intervalo de concentraciones de péptido de 20 a 0,1 ng/ml. Como se muestra en la **Figura 17A**, el cocultivo de linfocitos T con DC cargadas con cada una de las tres concentraciones de péptidos analizadas dio como resultado niveles fácilmente detectables de linfocitos T 4-1BB/OX40, incluyendo hasta aproximadamente el 80 % a 1 ng/ml de péptido. El aumento en la expresión del marcador de activación de linfocitos T en comparación con las células cultivadas con DC descargadas se muestra en la **Figura 17B**, donde 0,1 ng/ml dieron como resultado el delta más grande pero las tres concentraciones de péptido dieron como resultado un cambio positivo. Estos datos demuestran que concentraciones de péptidos inferiores a 20 ng/ml pueden dar como resultado una mayor regulación positiva de los marcadores de activación de linfocitos T (marcadores de regulación positiva) después del cocultivo.
- 60 65
- La **Figura 16** representa de manera similar la activación de linfocitos T derivados de tumores como una función de la expresión de 41BB/OX40 en estudios en los que las DC fueron pulsadas con uno o dos péptidos para su presentación en la superficie durante el cocultivo. Se muestra en la **Figura 18A** y de nuevo en **Figura 18B** como factor de cambio, que las DC que se cargaron con un solo péptido fueron notablemente más eficientes en la activación de linfocitos T en cocultivo.
- Como se muestra en la **Figura 19**, los marcadores de activación de linfocitos T 41BB y OX40 aumentaron sustancialmente cuando los linfocitos T derivados de tumores se cultivaron conjuntamente con DC en una proporción

de 1:2 (linfocitos T: DC) en comparación con 1:1.

Ejemplo 7 Enriquecimiento y recuperación de linfocitos T activados por clasificación celular

5 Se aislaron linfocitos T de un donante sano mediante selección basada en inmunoafinidad y luego se crioconservaron. Los linfocitos T se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche, y luego se activaron con 50 ng/ml de OKT3 durante 24 - 48 horas antes de teñirlas con FITC anti-CD4 (BD), anti-CD5 PerCPCy.5.5 (BD), anti-CD134 (Beckman Coulter) y anti-CD137 (MAC Miltenyi). Las células se llevaron a una concentración de aproximadamente 20×10^6 células/ml y se clasificaron utilizando BD FACSAriaII a una velocidad de clasificación de aproximadamente 15.000 acontecimientos por segundo. Se dibujó una acotación alrededor de las células que expresan CD134, CD137, o tanto CD134 como CD137 y se clasificaron en una sola población. Esta fue la población clasificada positivamente. Las células que carecían de expresión de CD134 y CD137 se clasificaron en una población separada. Esta fue la población clasificada negativamente. Después de la clasificación, las células de las poblaciones clasificadas positivas y negativas y de la población no clasificada se analizaron en un citómetro de flujo alternativo para verificar la pureza y evaluar las tasas de recuperación.

20 Como se muestra en la **Figura 20**, la población de linfocitos T derivados de tumores sin clasificar (pre-clasificación) se comparó con la población clasificada positiva que se recogió después del cocultivo con células dendríticas autólogas cargadas con péptidos mutantes como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 6 y se clasificó en poblaciones positivas para 41BB/OX40. Se observó que esta estrategia de activación tuvo como resultado un mayor enriquecimiento del porcentaje de TCR reactivo para tres donantes (**Figura 20A**) y reactividad promedio de Clase I (**Figura 20B**).

25 La recuperación total de células de la clasificación de células se muestra con respecto a la entrada total de células en la **Figura 21A**. Visto de manera similar en la **Figura 21B**, el porcentaje de recuperación de dos rondas independientes fue aproximadamente del 80 %. Los resultados demuestran que es posible obtener una alta recuperación de células después de la selección y clasificación de células positivas para marcadores de regulación positiva.

30 La **Figura 22** representa la pureza de la población de CD4+ mediante citometría de flujo de linfocitos T de donantes sanos activadas con OKT3 y teñidas como se ha descrito anteriormente. Las células se acotaron por primera vez en CD4+, a continuación, se seleccionó la población que expresaba la intensidad más alta de CD134 y se mostraron las salidas que mostraban CD4+ frente a CD8+ y CD137 frente a CD134. Estos datos respaldan el uso de estos marcadores para seleccionar una población de alta pureza de linfocitos T infiltrantes de tumores.

Ejemplo 8 Expansión post- clasificación de linfocitos T derivados de tumores activados

40 Se procesaron linfocitos T procedentes de un tumor de CRC primario como se describe en el Ejemplo 1 y después se cultivaron conjuntamente con células dendríticas presentadoras de péptidos, usando métodos como se describe en el Ejemplo 6. Brevemente, se cultivaron linfocitos infiltrantes de tumor aislados con DC autólogas que se cargaron para expresar péptido asociado con tejido sano (tipo silvestre, WT), péptido asociado con tejido tumoral (Mutante), o no cargados con ningún péptido (Sin péptido). Se cultivó una subpoblación de control de linfocitos T sin DC (no activadas). Después del co-cultivo, las células se clasificaron mediante Sony FX500 habilitada para fluorescencia basada en la expresión superficial de los marcadores de activación 4-1BB y OX40.

45 A continuación, se sembraron las células en una placa de cultivo de 24 pocillos permeable a los gases a 250.000-1.000.000 células/cm² en medio OpTmizer sin suero suplementado con IL-2 recombinante a una concentración de 300 U/ml, gentamicina a 10 µg/ml y 2,0 mM de una forma dipéptido de glutamina L-alanil-L-glutamina (suplemento GlutaMAX; Thermofisher). Las células se incubaron durante un total de 7 días y el 50 % del medio se intercambiaba cada dos días a partir del día 5 de cultivo. Los recuentos celulares se realizaron utilizando el contador celular automatizado NC-200 (Chemometec) durante cada día del cultivo.

55 Como se muestra en la **Figura 23A** y de nuevo en la **Figura 23B** como factor de expansión, cada población de linfocitos T de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) analizada experimentó una expansión mensurable entre los días de cultivo 3 y 5 y continuó con una tendencia ascendente al finalizar el período de cultivo de 7 días. Los linfocitos T infiltrantes de tumor cultivados con DC cargadas con péptido mutante asociado a tumores alcanzaron el número total de células más alto durante el transcurso del experimento.

60 Usando los datos anteriores, se creó un modelo matemático teórico mostrado en la **Figura 23C** para predecir la relación entre la cantidad de células recuperadas después de la clasificación y la cantidad esperada de células presentes en el cultivo después de la fase de expansión.

Ejemplo 9 Modelo de Montecarlo ex vivo Expansión de linfocitos T derivados de tumores

65 Como complemento al análisis de puntos determinista del Ejemplo 8, se diseñó una primera simulación probabilística de Monte Carlo para pronosticar el número de linfocitos infiltrantes de tumor resultantes de una primera expansión como se describe en el Ejemplo 2. Se realizaron simulaciones de Monte Carlo del número probable de linfocitos T

totales viables y totales reactivos después de la extracción y una primera expansión sustituyendo una distribución de probabilidad por dos factores de incertidumbre inherente, la eficacia de recuperación y el factor de capacidad de expansión. Los resultados se calcularon iterativamente decenas de miles de veces como una distribución normal en la que se definió un valor medio de células recuperadas para la recuperación baja y media, y se definió un valor medio para el factor de cambio en la expansión para los potenciales de expansión baja, media y alta. A continuación, se calcularon las distribuciones para el número total de linfocitos T viables, así como para el total de linfocitos T reactivos.

Para las simulaciones iniciales de Monte Carlo, en donde se calculan las probables salidas de linfocitos T para una primera expansión, se realizaron casos de prueba para establecer un modelo de condiciones de recuperación baja/expansión baja, recuperación media/expansión baja, recuperación media/expansión media y recuperación media/expansión alta. Los valores de la media y la desviación estándar para las variables de recuperación y expansión se asignaron de la siguiente manera: (1) la recuperación baja se definió como el cultivo de un total de 20 millones de células viables del tumor procesado con una desviación estándar de 6 millones, (2) la recuperación media se definió como 50 o 60 millones de células con una desviación estándar de 15 millones, (3) un primer factor de expansión baja se definió como 50 veces con una desviación estándar de 11, (4) la expansión media se definió como 75 veces con una desviación estándar de 15, y (5) la expansión alta se definió como 500 veces con una desviación estándar de 160.

Los datos para cada caso de prueba de las primeras simulaciones de Monte Carlo A se muestran en la **Tabla E1** a continuación.

Tabla E1: Simulaciones Monte Carlo para una primera expansión				
		<i>Total de linfocitos T infiltrantes de tumores viables</i>		<i>Total de linfocitos T infiltrantes de tumores reactivos</i>
Condiciones de ensayo	Suposiciones	Estadísticos	Valores de pronóstico	Valores de pronóstico
Recuperación baja/Expansión baja	Media = 20	Media	1,99 x10 ⁷	1,59 x10 ⁶
	Desv. est. = 6	Mediana	1,99 x10 ⁷	1,51 x10 ⁶
	Media = 50 Desv. est. = 11	Distribución de probabilidad (Percentil 10-90)	1,22 x 10 ⁷ - 2,76 x 10 ⁷	7,48 x 10 ⁵ - 2,53 x 10 ⁶
Recuperación media/Expansión baja	Media = 50	Media	4,99 x10 ⁷	3,99 x10 ⁶
	Desv. est. = 15	Mediana	5,00 x10 ⁷	3,81 x10 ⁶
	Media = 50 Desv. est. = 11	Distribución de probabilidad (Percentil 10-90)	3,05 x 10 ⁷ - 6,93 x 10 ⁷	1,85 x 10 ⁶ - 6,34 x 10 ⁶
Recuperación media/Expansión media	Media = 60	Media	6,00 x10 ⁷	4,81 x10 ⁶
	Desv. est. = 15	Mediana	5,99 x10 ⁷	4,63 x10 ⁶
	Media = 75 Desv. est. = 15	Distribución de probabilidad (Percentil 10-90)	4,07 x 10 ⁷ - 7,91 x 10 ⁷	4,07 x 10 ⁷ - 7,91 x 10 ⁷
Recuperación media/Expansión alta	Media = 60	Media	4,78 x10 ⁷	5,99 x10 ⁷
	Desv. est. = 15	Mediana	4,60 x10 ⁷	6,00 x10 ⁷
	Media = 500 Desv. est. = 160	Distribución de probabilidad (Percentil 10-90)	4,07 x 10 ⁷ - 7,94 x 10 ⁷	2,43 x 10 ⁶ - 7,40 x 10 ⁶

Usando estos datos, se diseñó un segundo conjunto de simulaciones de Monte Carlo para predecir el número final de linfocitos infiltrantes de tumor reactivos después del cocultivo con APC, clasificación mediante citometría de flujo, y una segunda expansión como se describe en el Ejemplo 8. Se asignó un valor fijo para el porcentaje de linfocitos T reactivos presentes en la población de linfocitos T totales cultivados a partir de fragmentos de tumor o SCS hasta una media del 8 % y una variación estándar de 2,50. Después de decenas de miles de cálculos iterativos, los datos para cada caso de prueba de las segundas simulaciones de Monte Carlo se muestran en la **Tabla E2** a continuación.

Tabla E2: Simulaciones Monte Carlo para una segunda y expansión final			
		Total de linfocitos T infiltrantes de tumores reactivos	
Condiciones de ensayo	Suposiciones	Estadísticos	Valores de pronóstico
Recuperación baja/Expansión baja	Media = 20	Media	7,96 x10 ⁷
	Desv. est. = 6	Mediana	7,34 x10 ⁷
	Media = 50 Desv. est. = 11	Distribución de probabilidad (Percentil 10-90)	3,41 x 10 ⁷ - 1,34 x 10 ⁸
Recuperación media/Expansión baja	Media = 50	Media	2,00 x10 ⁸
	Desv. est. = 15	Mediana	1,85 x10 ⁸
	Media = 50 Desv. est. = 11	Distribución de probabilidad (Percentil 10-90)	8,44 x 10 ⁷ - 3,33 x 10 ⁸
Recuperación media/Expansión media	Media = 60	Media	3,61 x10 ⁸
	Desv. est. = 15	Mediana	3,39 x10 ⁸
	Media = 75 Desv. est. = 15	Distribución de probabilidad (Percentil 10-90)	1,68 x 10 ⁸ -5,80 x 10 ⁸
Recuperación media/Expansión alta	Media = 60	Media	2,39 x10 ⁹
	Desv. est. = 15	Mediana	2,19 x10 ⁹
	Media = 500 Desv. est. = 160	Distribución de probabilidad (Percentil 10-90)	9,57 x 10 ⁸ - 4,06 x 10 ⁹

5 El potencial de recuperación y expansión de los linfocitos T reactivos infiltrantes de tumor a partir de una primera expansión después del procesamiento del tumor o una segunda expansión después del cocultivo posterior con APC son factores que son inherentemente variables entre los donantes y dentro de una población de células tumorales. El intervalo esperado de números de linfocitos T generados por el proceso descrito aquí está contenido dentro de los percentiles 10 y 90. Es poco probable que se generen números de células por debajo del percentil 10 y que probablemente no den como resultado un medicamento utilizable. Consiguientemente, las observaciones de las simulaciones de Monte Carlo de las **Tablas E1 y E2** apoyan que en todos los escenarios entre los percentiles 10 y 90, dado un intervalo de niveles de variabilidad para los potenciales de expansión, el método descrito en el presente documento probablemente proporcionará una producción sólida de linfocitos T que sea aproximada al número de células que se requerirían para la dosis terapéutica.

15 **Ejemplo 10 Ejemplo 10: Evaluación del enriquecimiento de TCR reactivos a tumores mediante la producción de IFN-gamma y la clonalidad de TCR**

20 Los linfocitos T procedentes de tumores primarios de pacientes con cáncer de ovario (Muestra A), CRC (Muestra B) o melanoma (Muestra C) se procesaron a partir de fragmentos de tumor como se describe en el Ejemplo 1. Tras la expansión inicial, se cultivaron conjuntamente linfocitos T con células dendríticas autólogas presentadoras de péptidos durante 6 horas usando métodos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 6. Para el cocultivo, las DC autólogas se cargaron con un único péptido largo mutante (por ejemplo, 25 unidades) exclusivo del tumor del paciente o con un único péptido largo de tipo silvestre que no estaba mutado en comparación con la muestra normal del paciente. Después del co-cultivo, los linfocitos T reactivos a tumores se enriquecieron tiñendo las células para determinar la expresión de 4-1BB (CD137) y/u OX40 (CD134) y las células se clasificaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células que fueron positivas para uno o ambos de 41BB y OX40 se recogieron como población "positiva" (también denominada población "enriquecida con mutantes") y las células que fueron doblemente negativas para 41BB y OX40 se recogieron como población "negativa" (también denominada población "no enriquecida de tipo silvestre").

30 A continuación se cultivaron las poblaciones de linfocitos T mutantes y de tipo silvestre durante 16 horas en medio solo o en condiciones para estimular la secreción de IFN-gamma. Los linfocitos T no enriquecidos sin clasificar (linfocitos T en masa) del cocultivo que no se habían clasificado según la expresión de 41BB y OX40 se incluyeron como control de preselección y se estimularon de manera similar. Se recogió el sobrenadante del cultivo y se

determinaron los niveles de secreción de IFN-gamma mediante ELISA.

El porcentaje de linfocitos T en la población clasificada que expresan un TCR reactivo al neopéptido peptídico se determinó mediante secuenciación de TCR de células individuales. La clonalidad de TCR en las poblaciones de linfocitos T también se determinó mediante secuenciación de ARN de células individuales para las cadenas TCR-beta y TCR-alfa.

1. Muestra A (cáncer de ovario)

Las poblaciones de linfocitos T enriquecidas con mutantes y de tipo silvestre, o linfocitos T de control en masa, producidas a partir de las células de tumor de la Muestra A se cultivaron durante 16 horas en medio solo o se estimularon mediante cultivo con anticuerpos anti-CD28 y anti-CD49d junto con el epítipo peptídico mínimo (8 unidades) correspondiente al péptido mutante (neopéptido) o el péptido de tipo silvestre del tumor del paciente respectivo. Como se muestra en la **Figura 24A**, los linfocitos T en masa mostraron una reactividad mejorada, como lo demuestra el aumento de la secreción de IFN-gamma, después del cultivo con el neopéptido en comparación con medios de cultivo solos. La capacidad para producir IFN-gamma aumentó aún más en la población de linfocitos T enriquecida con mutantes que fue estimulada con el neopéptido, pero no se observaron diferencias en la población de linfocitos T enriquecida de tipo silvestre después de la estimulación en medios solos frente a la estimulación con condiciones de neopéptido. Adicionalmente, la población de linfocitos T no enriquecida de tipo silvestre todavía incluía cierto grado de linfocitos T reactivos al neoantígeno, como se demuestra por su regulación positiva de la secreción de IFN-gamma en comparación con los medios solos. Estos datos indican que los linfocitos T en masa después del cocultivo contienen una población reactiva al neoantígeno, que está enriquecida mediante la clasificación basada en la expresión de 41BB y OX40. Además, los resultados también demuestran la especificidad del enriquecimiento de neoantígeno.

El análisis de los TCR específicos de neopéptido mediante secuenciación de ARN y citometría de flujo mostró un enriquecimiento de los TCR específicos de neoantígeno TCR "A" en las poblaciones de linfocitos T enriquecidas con mutantes con un 17 % de TCR específicos de neoantígeno en comparación con un 2 % en la población inicial de linfocitos T en masa o 0,1 % en la población de linfocitos T enriquecida de tipo silvestre (**Figura 24B**). La clonalidad de TCR de linfocitos T en la población no seleccionada (población de linfocitos T enriquecida de tipo silvestre) en comparación con la población seleccionada (población de linfocitos T enriquecida con mutantes) se muestra en la **Figura 24C**, lo que muestra que la diversidad de TCR entrante es alta en la población de linfocitos T no clasificada y que se logra el enriquecimiento de clones de TCR únicos en la población seleccionada. La **Figura 24D** demuestra que las poblaciones de células pre-clasificación (en masa) y post-clasificación contienen linfocitos CD4 y CD8, lo que indica que las células reactivas de clase I y clase II están presentes en la población enriquecida.

2. Muestra B (paciente con CRC)

Las poblaciones de linfocitos T enriquecidas con mutantes y de tipo silvestre, o linfocitos T de control en masa, producidas a partir de células tumorales de la Muestra B se cultivaron durante 16 horas en medio solo o se estimularon en respuesta a una estimulación general de TCR utilizando un anticuerpo anti-CD3 (OKT3). Como se muestra en la **Figura 25A**, todas las poblaciones de linfocitos T mostraron funcionalidad (es decir, producción de IFN γ) después del cocultivo y clasificación en respuesta a la estimulación general de TCR.

El análisis de los TCR específicos de neopéptido mostró un enriquecimiento de los TCR específicos de neoantígeno "B" en las poblaciones de linfocitos T enriquecidas con mutantes con un 71 % de TCR específicos de neoantígeno en comparación con el 42 % en la población inicial de linfocitos T en masa o el 17 % en la población de linfocitos T enriquecida de tipo silvestre (**Figura 25B**). En comparación con los linfocitos T en masa después del cocultivo, esto representa un enriquecimiento aproximado de 1,7 veces en los linfocitos T reactivos a tumores en la población de linfocitos T clasificada y una reducción aproximada de 2,5 veces en los linfocitos T reactivos a tumores en la población de linfocitos T no clasificada. La clonalidad de TCR de linfocitos T en la población no seleccionada (población de linfocitos T enriquecida de tipo silvestre) en comparación con la población seleccionada (población de linfocitos T enriquecida con mutantes) se muestra en la **Figura 25C**, lo que muestra que la diversidad de TCR entrante es alta en la población de linfocitos T no clasificada (807 clones de TCR únicos) y que el enriquecimiento del clon de TCR único se logra en la población seleccionada (64 clones de TCR únicos). La **Figura 25D** demuestra que las poblaciones de células pre-clasificación (en masa) y post-clasificación contienen linfocitos CD4 y CD8, lo que indica que las células reactivas de clase I y clase II están presentes en la población enriquecida.

3. Muestra C (Paciente con melanoma)

Los linfocitos T de las poblaciones de linfocitos T enriquecidas con mutantes y de tipo silvestre, o linfocitos T de control en masa, producidos a partir de células tumorales de la Muestra C se evaluaron para detectar TCR específicos de neopéptido mediante secuenciación de ARN y citometría de flujo y clonalidad de TCR. Los resultados mostraron un enriquecimiento de TCR específicos de neoantígeno "C" en las poblaciones de linfocitos T enriquecidas con mutantes con un 33 % de TCR específicos de neoantígeno en comparación con el 5 % en la población inicial de linfocitos T en masa o el 4 % en la población de linfocitos T enriquecida de tipo silvestre (**Figura 26A**). En comparación con los

linfocitos T en masa después del cocultivo, esto representa un enriquecimiento aproximado de 7 veces en los linfocitos T reactivos a tumores en la población de linfocitos T clasificada, y ningún enriquecimiento en linfocitos T reactivos a tumores en la población de linfocitos T no clasificada. La clonalidad de TCR de linfocitos T en la población no seleccionada (población de linfocitos T enriquecida de tipo silvestre) en comparación con la población seleccionada (población de linfocitos T enriquecida con mutantes) se muestra en la **Figura 26B**, lo que muestra que la diversidad de TCR entrante es alta en la población de linfocitos T no clasificada (182 clones de TCR únicos) y que el enriquecimiento del clon de TCR único se logra en la población seleccionada (15 clones de TCR únicos). La **Figura 26C** demuestra que las poblaciones de células pre-clasificación (en masa) y post-clasificación contienen linfocitos CD4 y CD8, lo que indica que las células reactivas de clase I y clase II están presentes en la población enriquecida.

4. Conclusión

Conjuntamente, los resultados muestran que la diversidad de TCR entrante es alta en la población de linfocitos T no clasificada (por ejemplo, 100-900 TCR). Esta población no clasificada produce un nivel bajo de IFNgamma (por ejemplo, 5-25 pg/ml). Después de clasificar la población de TCR según los marcadores de activación, por ejemplo, OX40/41BB, la población de TCR está enriquecida en una población reactiva de TCR (por ejemplo, 15-64 TCR) que produce más IFNgamma (por ejemplo, 65,3-98,6 pg/ml) que la población de TCR sin clasificar y con clasificación negativa (5 pg/ml). Los resultados indican que se trata de una activación específica concordante con el enriquecimiento de linfocitos T reactivos a tumores, ya que no se observa en los cocultivos sin clasificar de tipo silvestre.

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar linfocitos T para usar en una composición celular terapéutica, en donde los linfocitos T expresan un receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un antígeno en la superficie de una célula diana, comprendiendo el método:
- a. procesar una muestra biológica que contiene una población de células linfocitos T obtenidas de un sujeto donante que tiene un tumor para producir una primera población de células linfocitos T;
 - b. estimular la primera población con uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para la expansión de linfocitos T en la población para producir una segunda población de linfocitos T activados en donde la estimulación se realiza en un sistema cerrado usando medio sin suero, en donde el uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante;
 - c. cocultivar la segunda población de linfocitos T en presencia de células presentadoras de antígeno que presentan uno o más péptidos no nativos en un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en un sistema cerrado usando medio sin suero, dichos uno o más péptidos no nativos son péptidos correspondientes a mutaciones somáticas no sinónimas asociadas en el tumor del sujeto, para producir una tercera población de células que contiene linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T endógenos reactivos a la mutación que codifica los péptidos del tumor;
 - d. seleccionar, de la tercera población de células, la población de linfocitos T que contiene TCR endógenos que son reactivos con los péptidos presentes en las APC basándose en uno o más marcadores de regulación positiva expresados en linfocitos T reactivos o activados en un sistema cerrado para producir una cuarta población que contiene los linfocitos T seleccionados; y
 - e. expandir la cuarta población de células seleccionadas en presencia de uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T en condiciones para expandir linfocitos T en la población en un sistema cerrado usando medio sin suero para producir una composición de linfocitos T expandidos para usar como una composición celular terapéutica, en donde el uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T es o comprende IL-2 recombinante.
2. El método de la reivindicación 1, en donde:
- (a) las células presentadoras de antígeno son células nucleadas tales como células dendríticas, fagocitos mononucleares, linfocitos B, células endoteliales o epitelio tímico, opcionalmente en donde las células presentadoras de antígeno son células dendríticas; y/o
 - (b) las células presentadoras de antígeno y/o los linfocitos T son autólogos del sujeto.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde los linfocitos T son linfocitos T CD4+, linfocitos CD8+, o linfocitos CD4+ y linfocitos CD8+.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:
- (A) el uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T comprende IL-2 recombinante y en donde la concentración de IL-2 recombinante es:
 - (i) de 100 UI/ml a 6000 UI/ml;
 - (ii) de 300 UI/ml a 1000 UI/ml; o
 - (iii) de o aproximadamente 300 UI/ml; y/o
 - (B) el uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T comprende IL-2 recombinante y en donde la concentración de IL-2 recombinante es:
 - (i) de 100 UI/ml a 6000 UI/ml;
 - (ii) de 300 UI/ml a 1000 UI/ml; o
 - (iii) de o aproximadamente 300 UI/ml.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:
- (i) el uno o más primeros agentes estimulantes de linfocitos T comprende IL-2 recombinante y la IL-2 recombinante está presente en una cantidad que es o es aproximadamente 6000 UI/ml; y/o
 - (ii) el uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T comprende IL-2 recombinante y la IL-2 recombinante está presente en una cantidad que es o es aproximadamente 6000 UI/ml.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el uno o más segundos agentes estimulantes de linfocitos T comprende además un anticuerpo anti-CD3, opcionalmente OKT3, opcionalmente en donde la concentración del anticuerpo anti-CD3 es de o aproximadamente 50 ng/ml.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el uno o más segundos agentes estimulantes de

linfocitos T comprende además células alimentadoras que son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que no se dividen, opcionalmente en donde las células alimentadoras se irradian con rayos gamma.

5 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el uno o más péptidos no nativos se cargan en células presentadoras de antígeno mediante pulso peptídico, opcionalmente en donde:

- (i) el pulso peptídico se lleva a cabo mediante electroporación;
- (ii) el uno o más péptidos no nativos tiene de 5-30 aminoácidos, opcionalmente 12-25 aminoácidos, opcionalmente de o aproximadamente 25 aminoácidos de longitud; y/o
- 10 (iii) el uno o más péptidos no nativos:

(a) son un grupo de péptidos y la concentración de péptidos en el grupo de péptidos para el pulso peptídico está entre o aproximadamente 0,001 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre 0,01 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre o aproximadamente 0,1 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre o aproximadamente 1 µg/ml y o aproximadamente 40 µg/ml, entre o aproximadamente 0,01 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml o entre o aproximadamente 1 µg/ml y o aproximadamente 10 µg/ml; o

(b) es un péptido individual y la concentración de péptidos individuales para el pulso peptídico está entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,00001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml, entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,1 µg/ml o entre o aproximadamente 0,0001 µg/ml y o aproximadamente 0,01 µg/ml, opcionalmente en donde la concentración de péptidos individuales del uno o más péptidos no nativos, en promedio, es de o aproximadamente 0,00001 µg/ml a o aproximadamente 0,01 µg/ml o la concentración de péptido individual de uno o más péptidos no nativos, en promedio, es de o aproximadamente 0,0001 µg/ml y de o aproximadamente 0,001 µg/ml.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la proporción de cocultivo entre células presentadoras de antígeno y linfocitos T está entre 20:1 y 1:1, entre 15:1 y 1:1, entre 10:1 y 1:1, entre 5:1 y 1:1, entre 2,5:1 y 1:1, entre 1:20 y 1:1, entre 1:15 y 1:1, entre 1:10 y 1:1, entre 1:5 y 1:1, o entre 1:2,5 y 1:1, opcionalmente en donde la proporción de cocultivo entre células presentadoras de antígeno y linfocitos T es o es aproximadamente 1:1.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el cocultivo es de 2 horas a 24 horas, opcionalmente en donde el cocultivo es de o aproximadamente 6 horas.

35 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la selección se realiza utilizando un clasificador de células basado en fluorescencia, opcionalmente en donde:

- (i) el clasificador de células basado en fluorescencia es un clasificador automatizado de citometría de flujo de alto rendimiento, opcionalmente un clasificador de células FX500 o un clasificador de células Miltenyi Tyto; y/o
- 40 (ii) la selección es de 1 ronda, 2 rondas, 3 rondas o 4 rondas mediante el clasificador de células basado en fluorescencia; y/o
- (iii) la selección se realiza a una velocidad de entre 10.000 y 100.000 células/segundo utilizando un clasificador de células fluidicas desechable de base fluorescente.

45 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el uno o más marcadores de regulación positiva se selecciona del grupo que consiste en CD107, CD107a, CD39, CD103, CD137 (4-1BB), CD59, CD69, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134 (OX40), CD258, CD256, PD-1, TIM-3 y LAG-3, opcionalmente en donde el uno o más marcadores de regulación positiva se seleccionan del grupo que consiste en CD107, CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134, CD258 y CD256.

50 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el uno o más marcadores de regulación positiva:

- (i) es CD134 y/o CD137; o
- (ii) comprende al menos dos marcadores seleccionados de CD107a y CD39, CD107a y CD103, CD107a y CD59, CD107a y CD90, CD107a y CD38, CD39 y CD103, CD39 y CD59, CD39 y CD90, CD39 y CD38, CD103 y CD59, CD103 y CD90, CD103 y CD38, CD59 y CD90, CD59 y CD38 y CD90 y CD38, opcionalmente en donde el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T comprenden además CD137, opcionalmente en donde el uno o más marcadores de regulación positiva de linfocitos T comprenden al menos dos marcadores seleccionados de CD107a y CD137, CD38 y CD137, CD103 y CD137, CD59 y CD137, CD90 y CD137 y CD38 y CD137.

60 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde:

- (i) la estimulación de la primera población es de 7 a 21 días, opcionalmente de 7 a 14 días; y/o
- (ii) la estimulación de la primera población en un sistema cerrado se realiza utilizando un recipiente de cultivo permeable a los gases; y/o
- 65 (iii) la estimulación de la primera población en un sistema cerrado se realiza utilizando un biorreactor.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde:
- 5 (i) la expansión de la cuarta población es de 7 a 21 días, opcionalmente de 7 a 14 días; y/o
 - (ii) la expansión de la cuarta población se realiza en un recipiente de cultivo permeable a los gases; y/o
 - (iii) la expansión de la cuarta población se realiza utilizando un biorreactor.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el tiempo desde el procesamiento de las muestras biológicas que contienen la población de linfocitos hasta la producción de los linfocitos T expandidos es inferior a 30 días.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde:
- 15 (i) el tumor es un tumor de un cáncer epitelial;
 - (ii) el tumor es un tumor de un melanoma, escamoso del pulmón, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer esofágico, cáncer colorrectal (CRC), cáncer de cuello de útero, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago o cáncer de útero; o
 - 20 (iii) el tumor es un tumor de un cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), CRC, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer colangiocarcinoma, cáncer de endometrio, opcionalmente en donde el cáncer de mama es cáncer de mama HR+/Her2-, cáncer de mama triple negativo (TNBC) o cáncer de mama HER2+.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la muestra biológica es un tumor y la población de linfocitos de la muestra biológica proviene de linfocitos infiltrantes de tumor.
- 25 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde:
- 30 A) la primera población de linfocitos se procesa como fragmentos de tumor de un tumor resecado, opcionalmente en donde la primera población de linfocitos es uno o más fragmentos de tumor del tumor resecado, más opcionalmente, en donde la primera población de linfocitos se siembra para estimulación en el sistema cerrado a aproximadamente 1 fragmento de tumor por 2 cm.²; o
 - 35 B) la primera población de linfocitos se procesa como una suspensión de células individuales mediante homogeneización y/o digestión enzimática de uno o más fragmentos de tumor de un tumor resecado, opcionalmente en donde la digestión enzimática se realiza mediante incubación con una colagenasa, opcionalmente colagenasa IV o colagenasa I/II, más opcionalmente en donde la primera población de linfocitos se siembra para estimulación en el sistema cerrado a aproximadamente 5 x 10⁵ a aproximadamente 2 x 10⁶ células totales por 2 cm².
- 40 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, que comprende además recoger las células producidas mediante el método, que opcionalmente comprende formular las células recogidas en un crioprotector.
- 45 21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la población de linfocitos T de la composición terapéutica es capaz de producir IFN γ a una concentración superior a o aproximadamente 30 pg/ml, opcionalmente superior a o aproximadamente 60 pg/ml, después de una estimulación específica del antígeno.

FIG. 1B

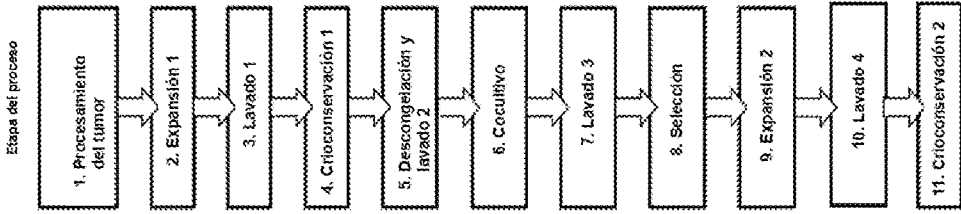
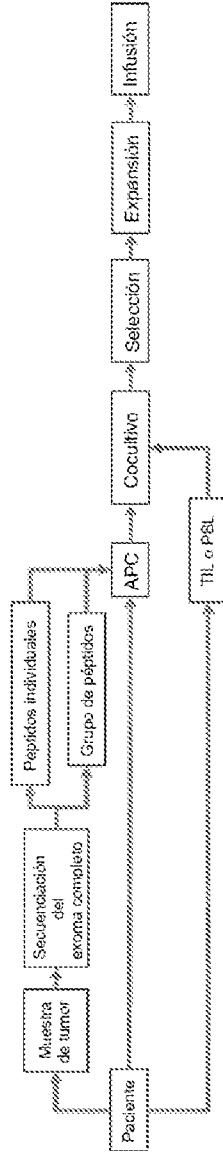
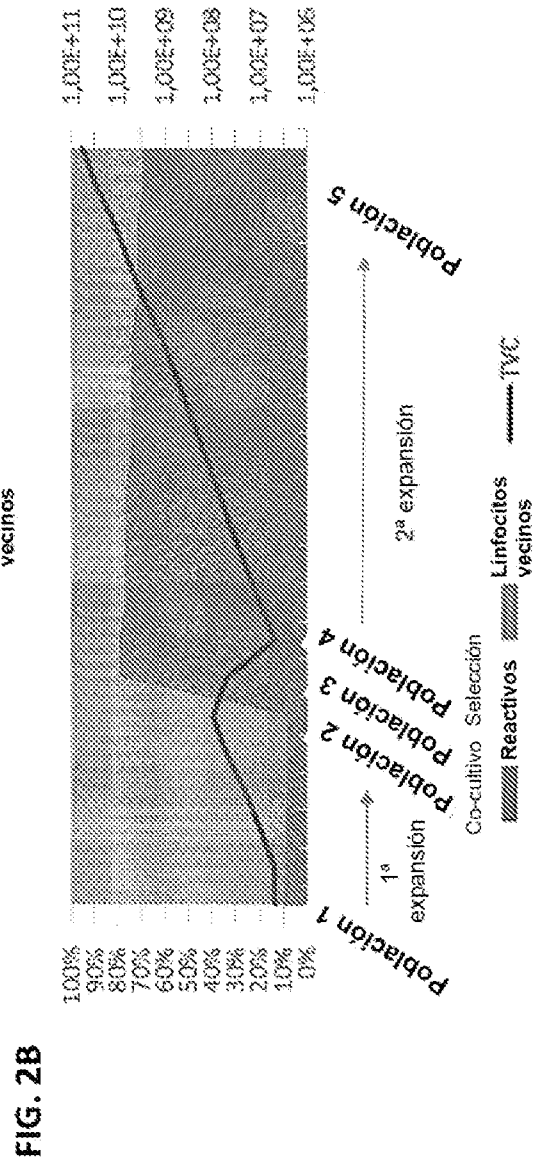
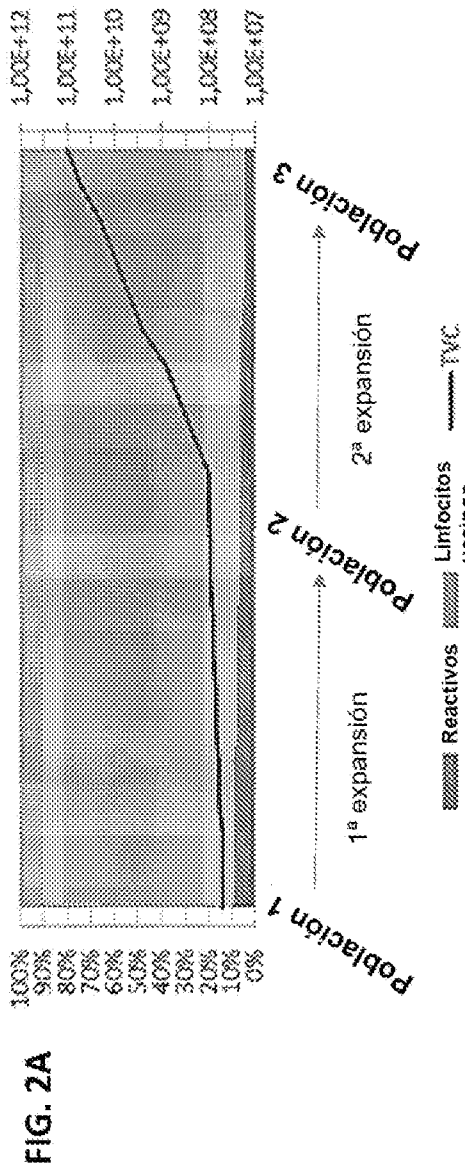


FIG. 1A





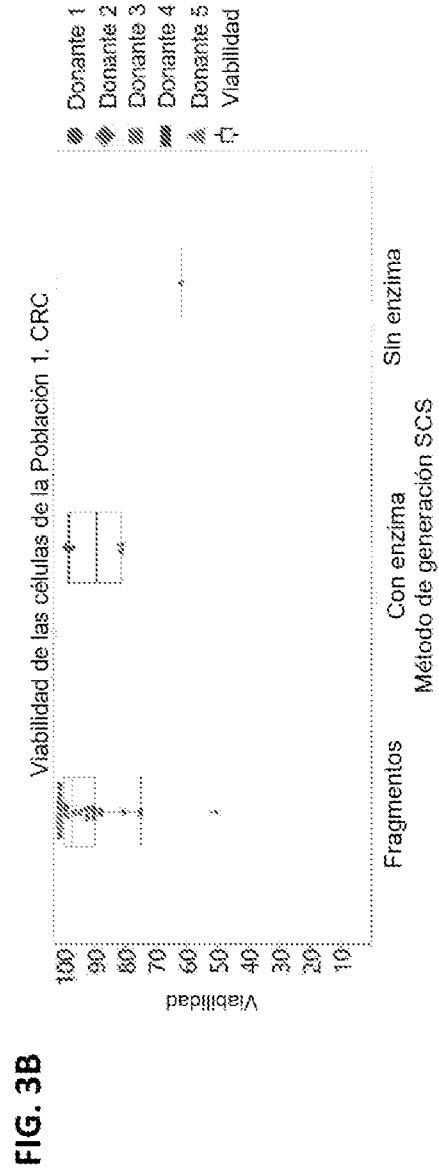
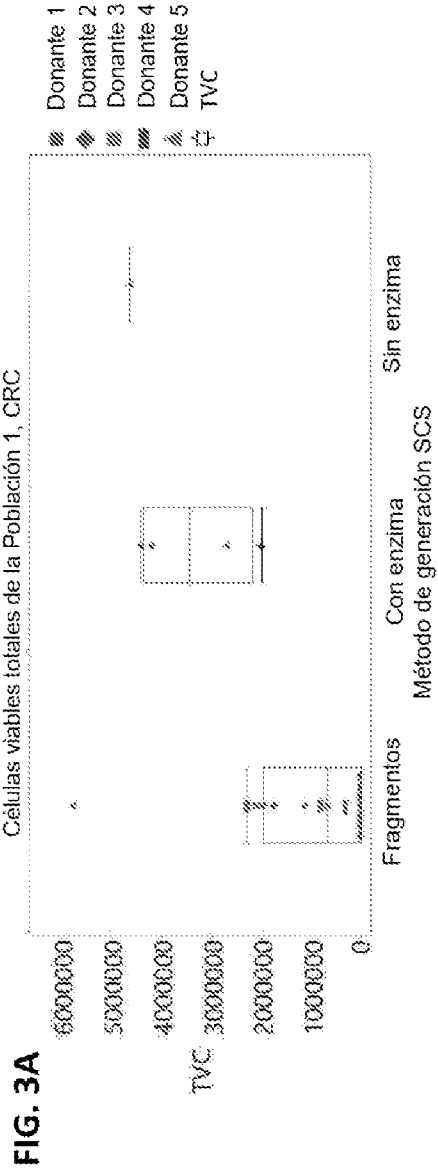


FIG. 4A

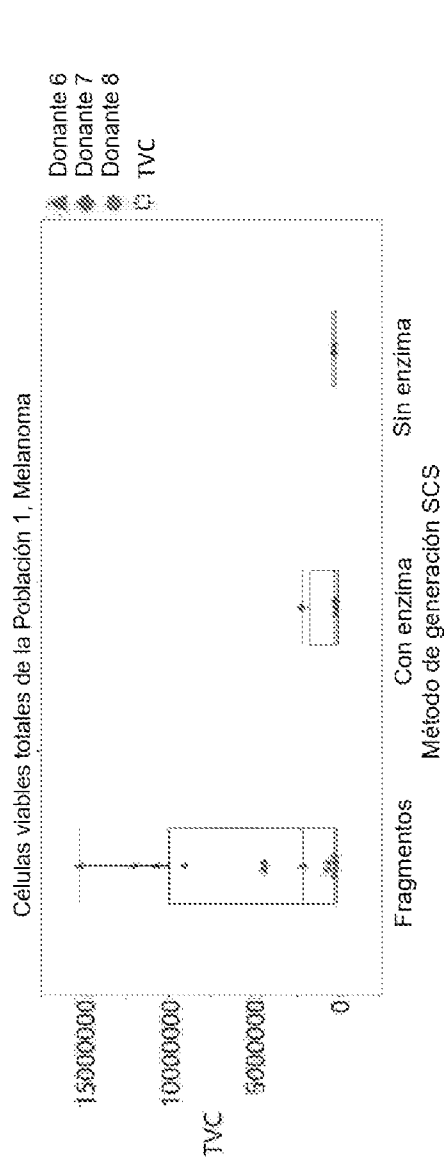
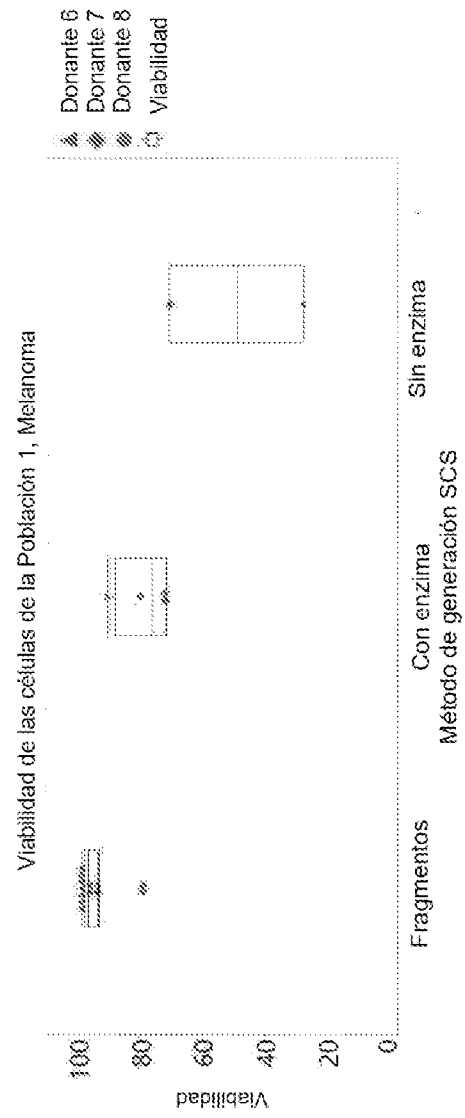
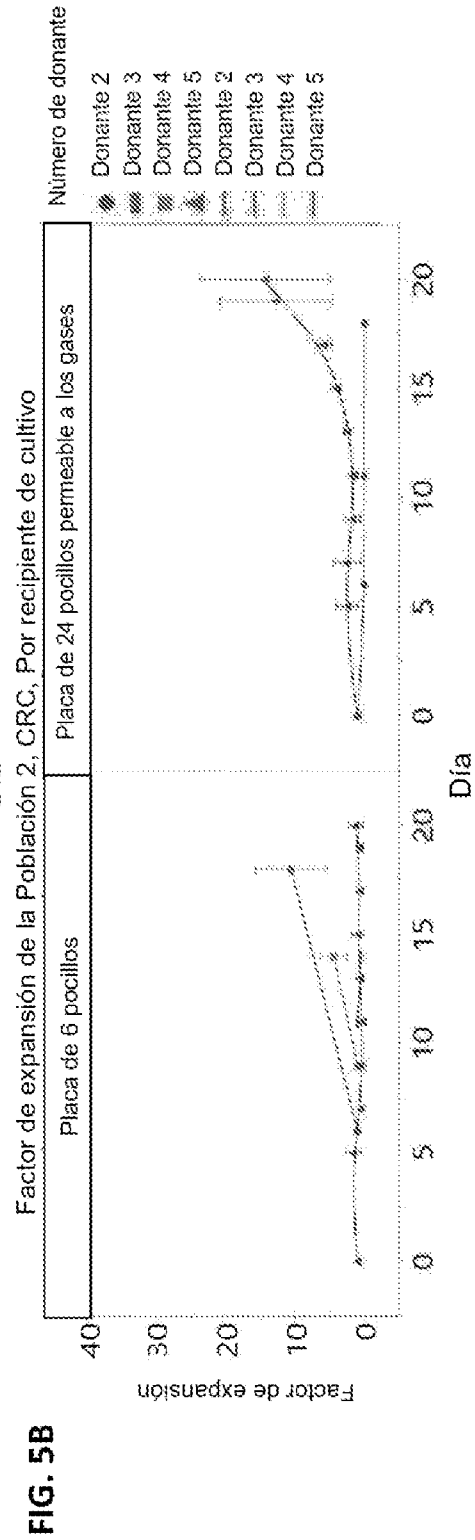
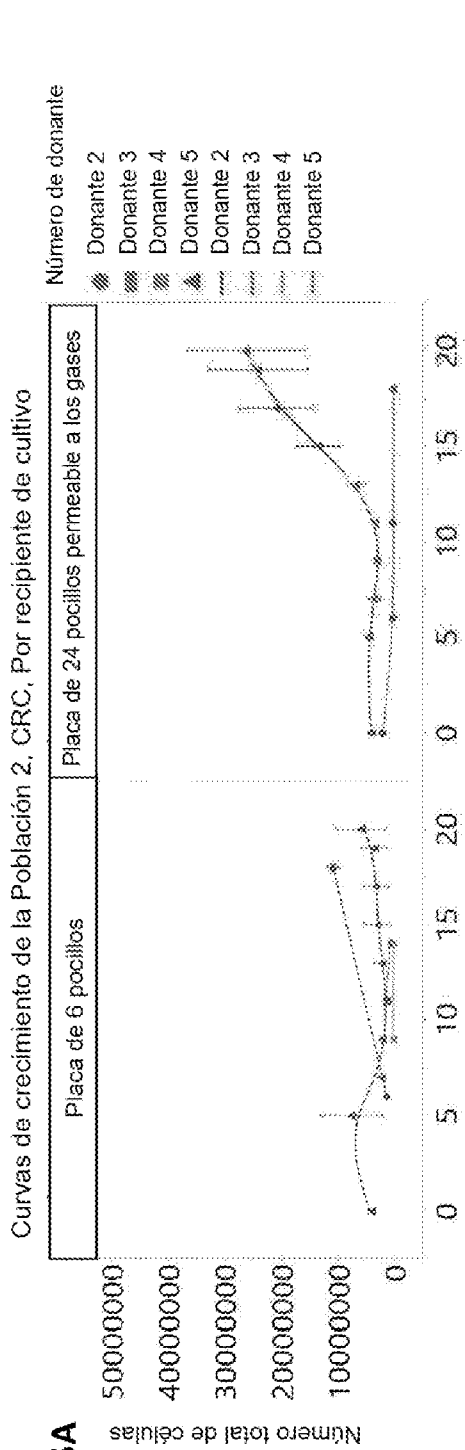
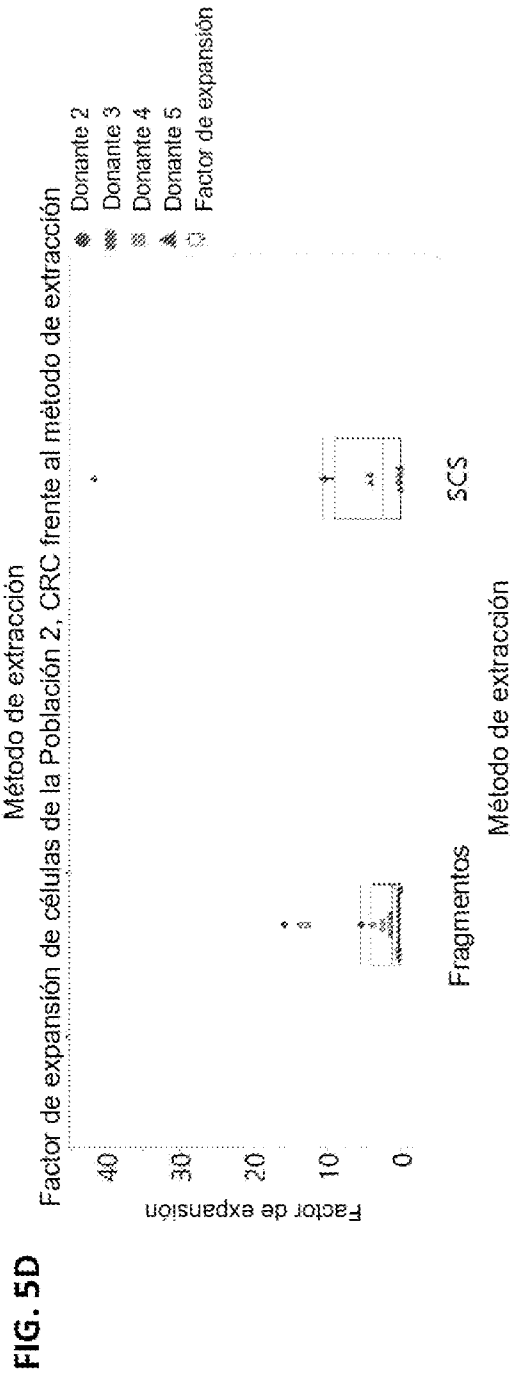
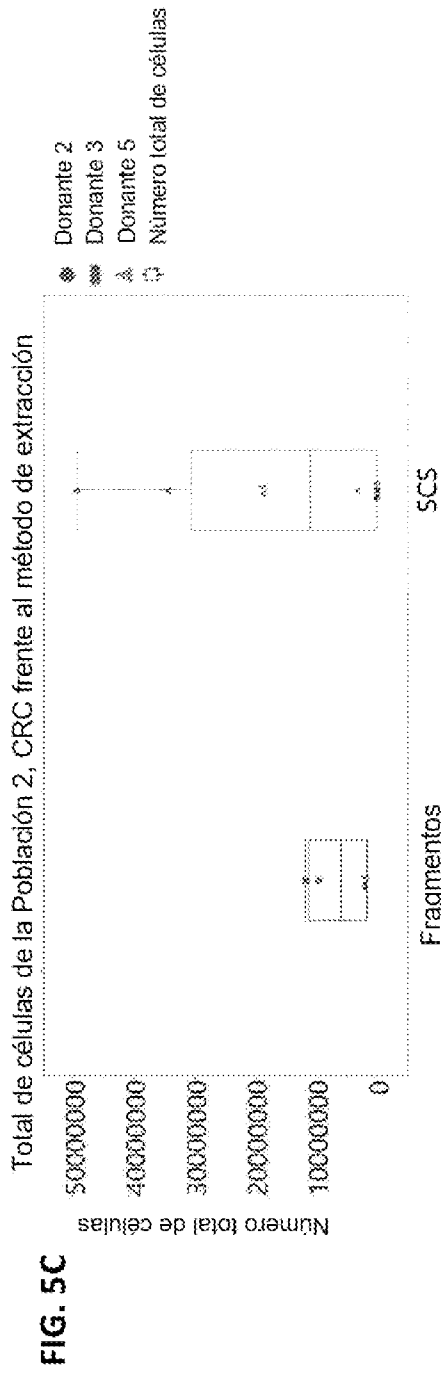
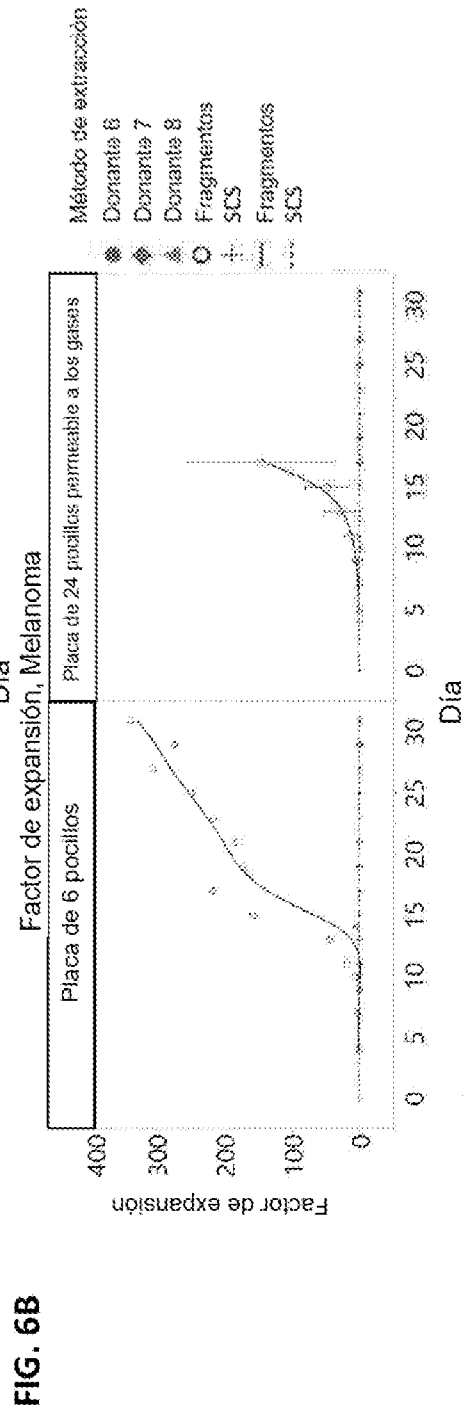
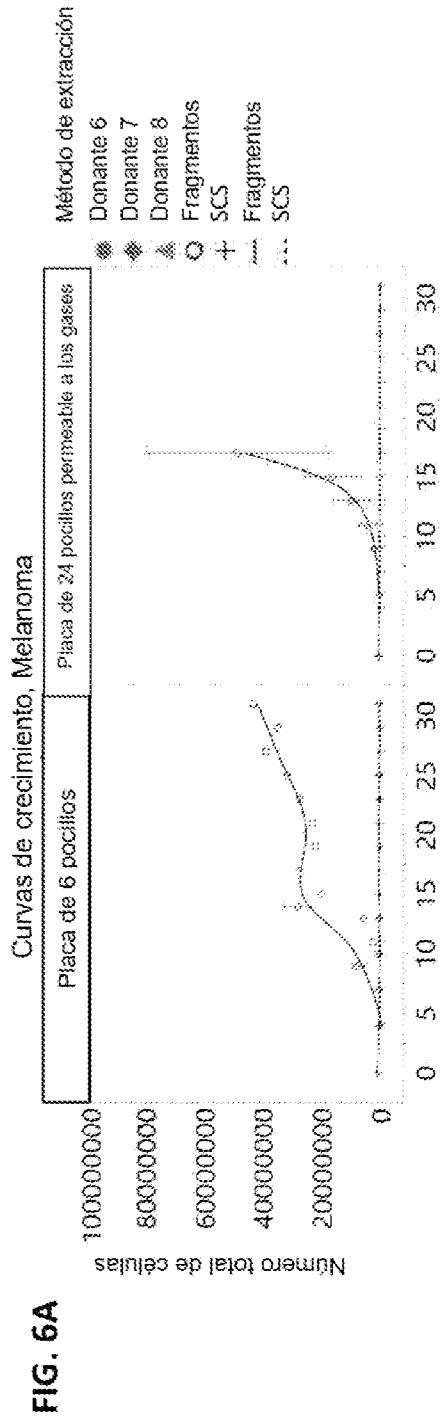


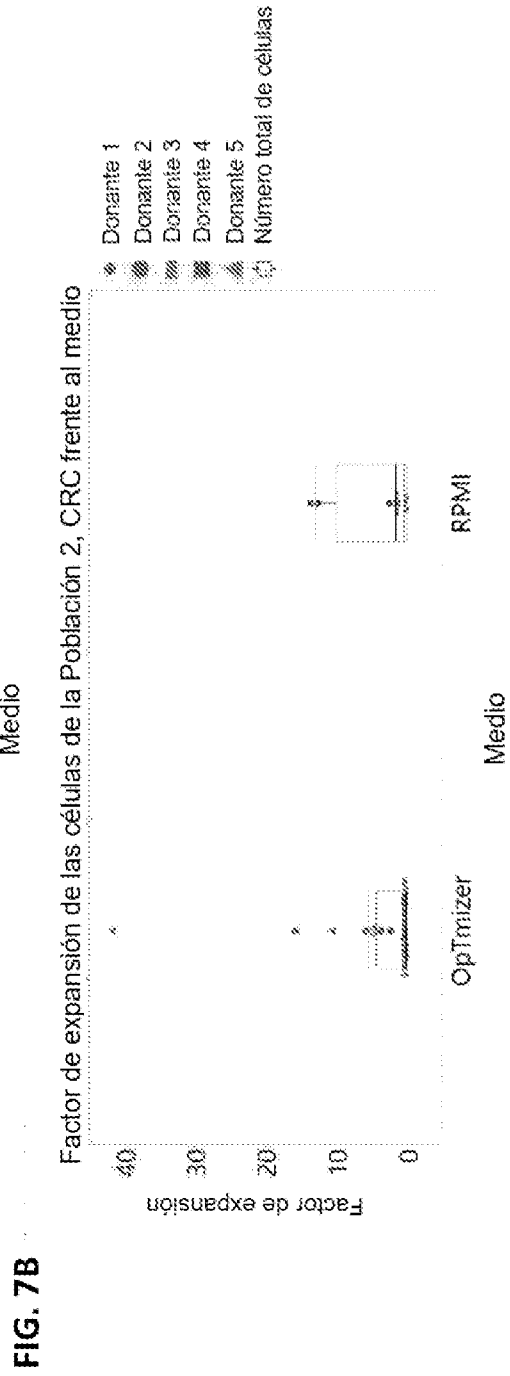
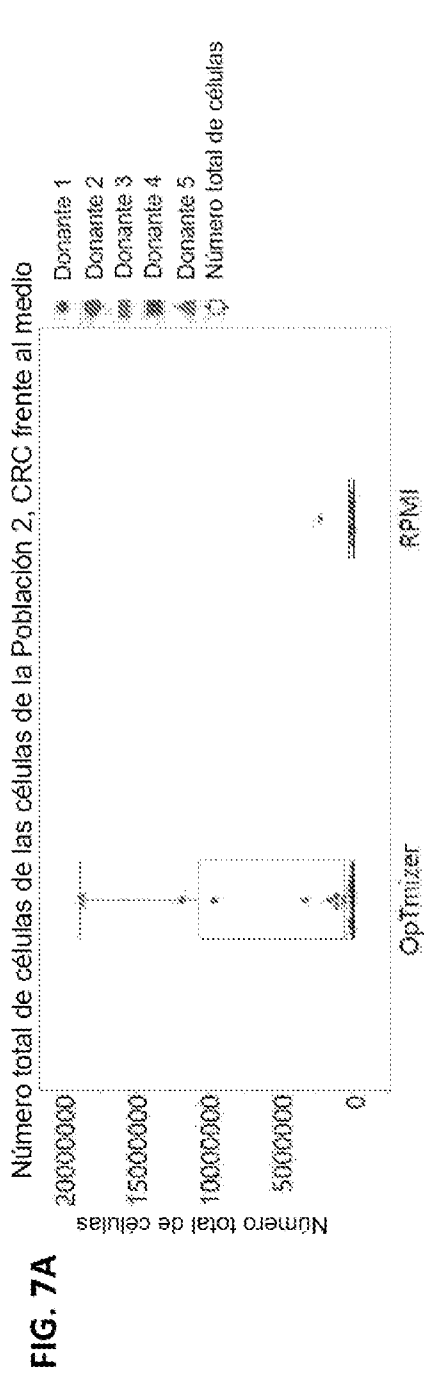
FIG. 4B

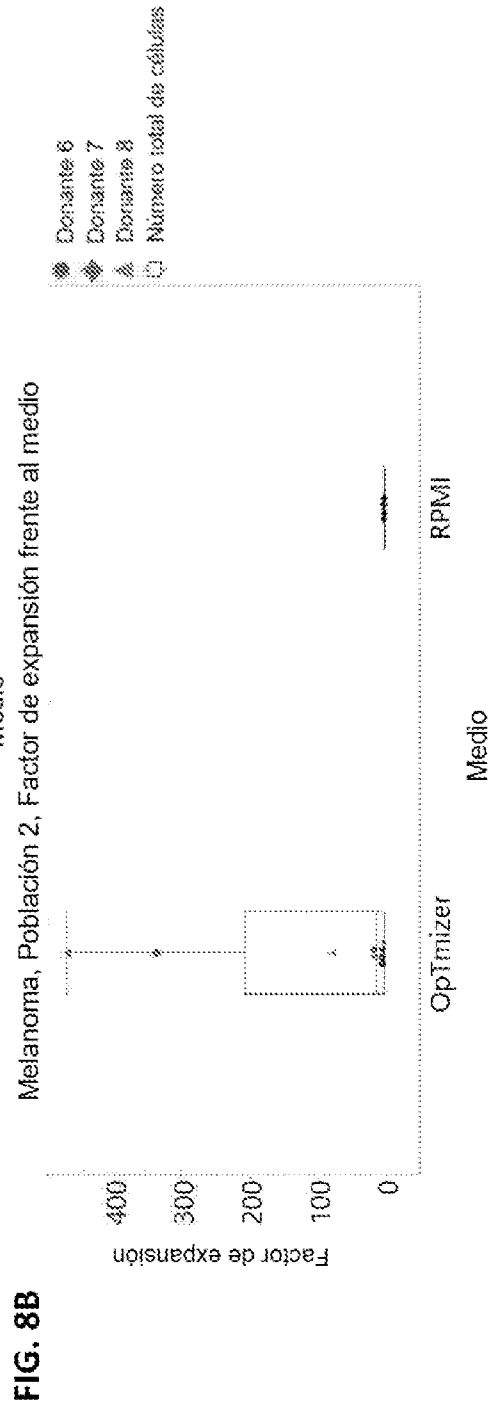
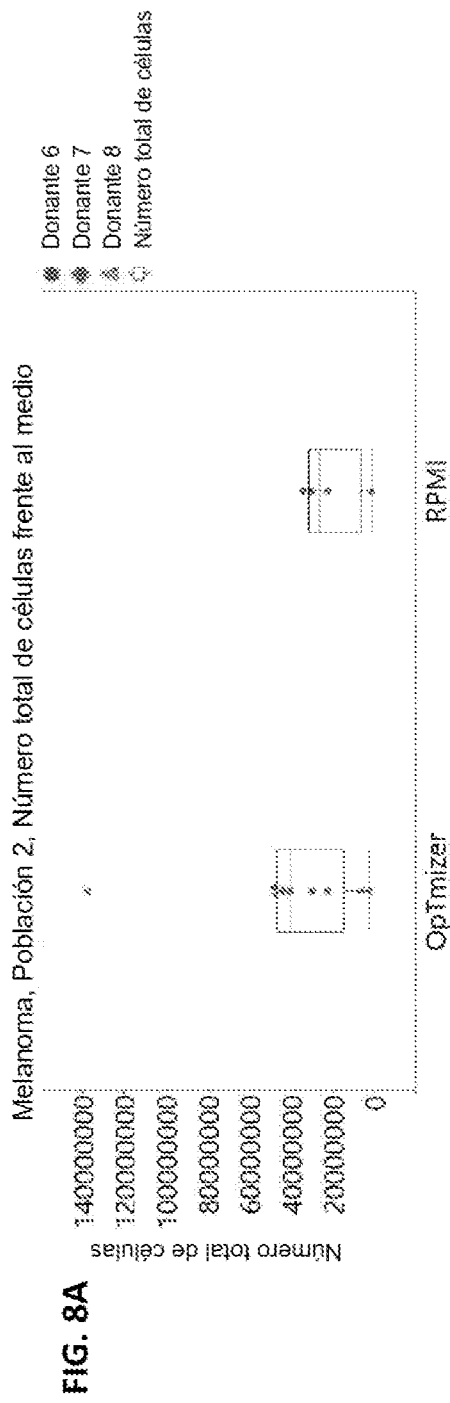


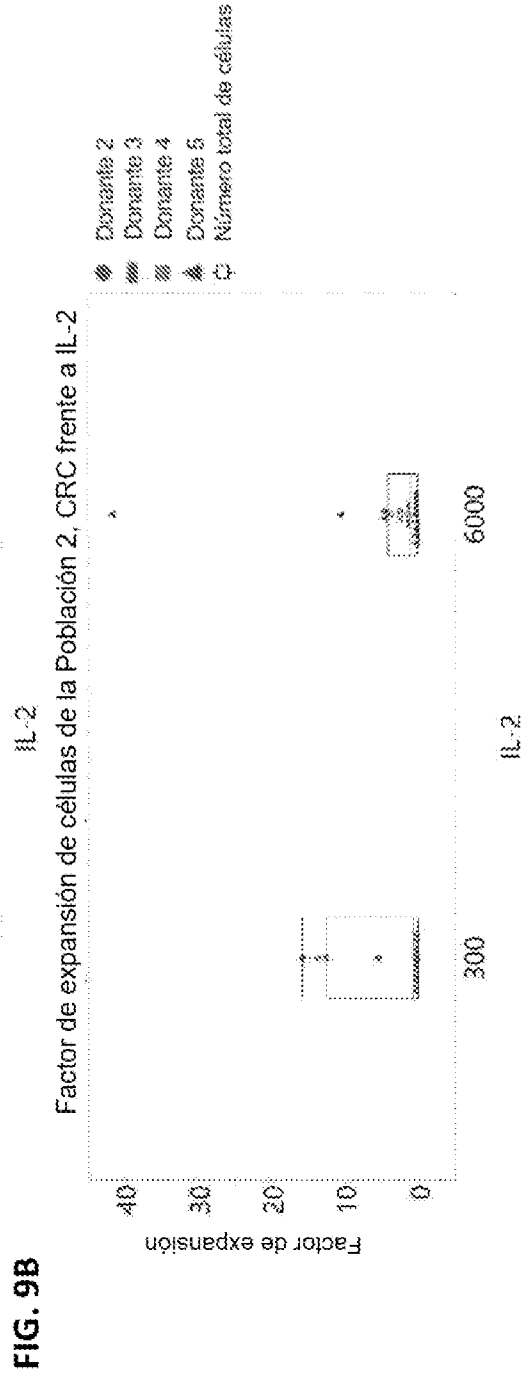
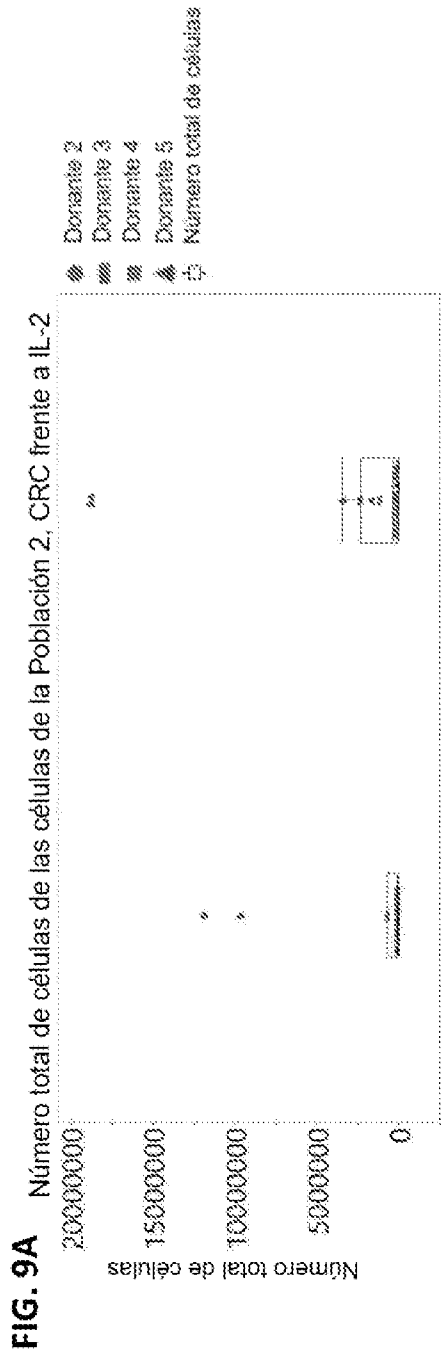


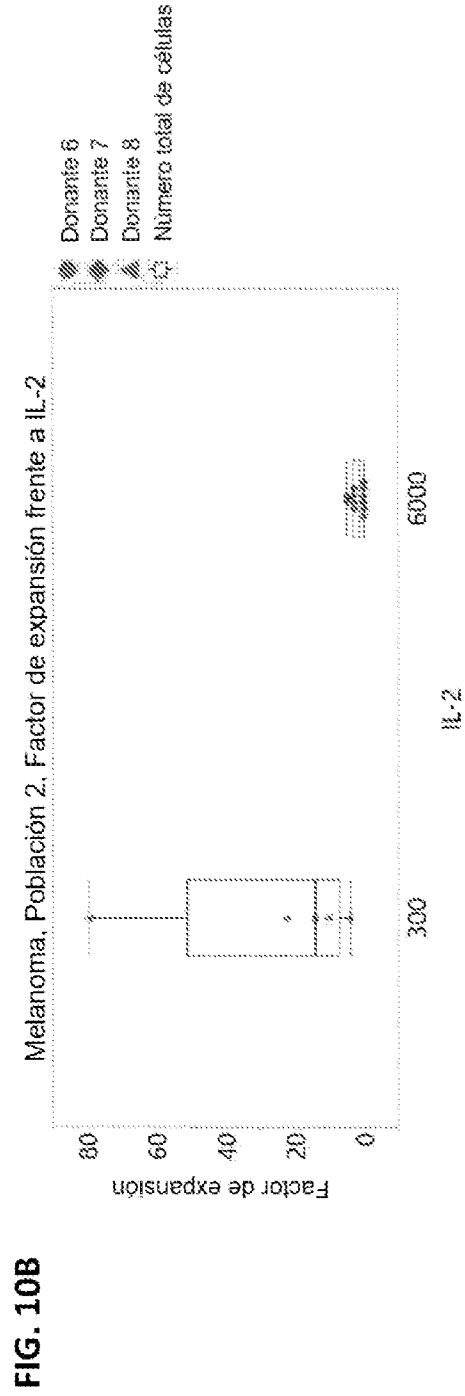
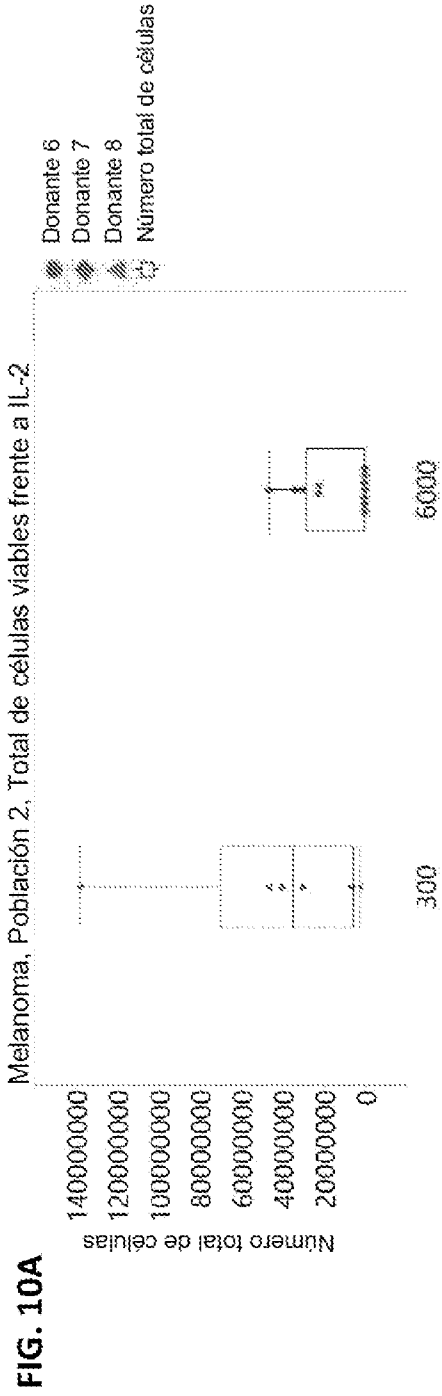












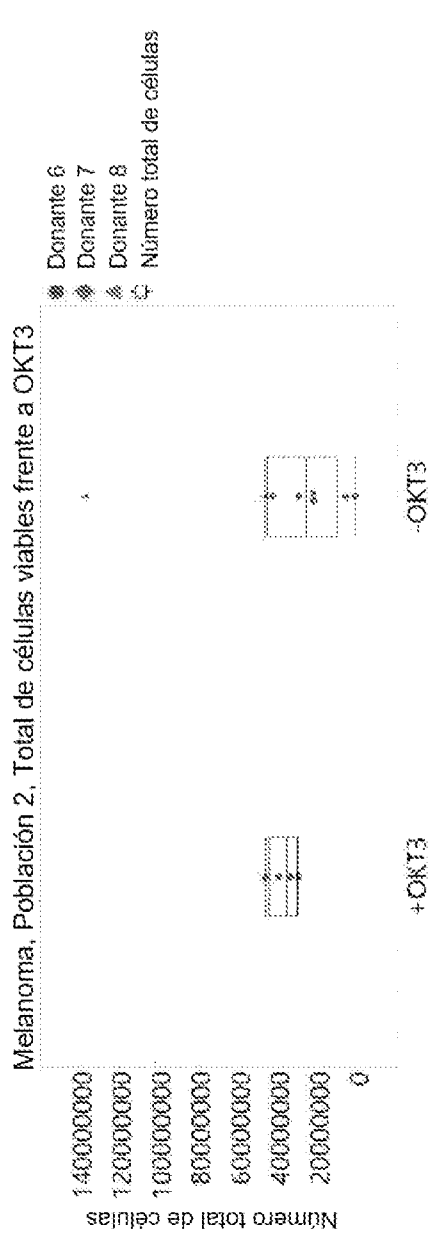


FIG. 11A

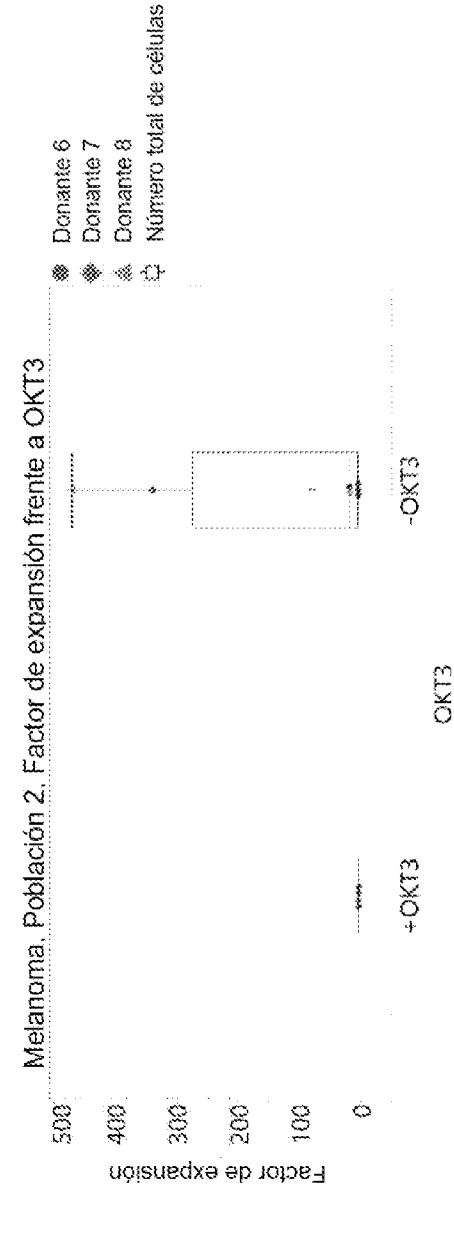


FIG. 11B

FIG. 12A

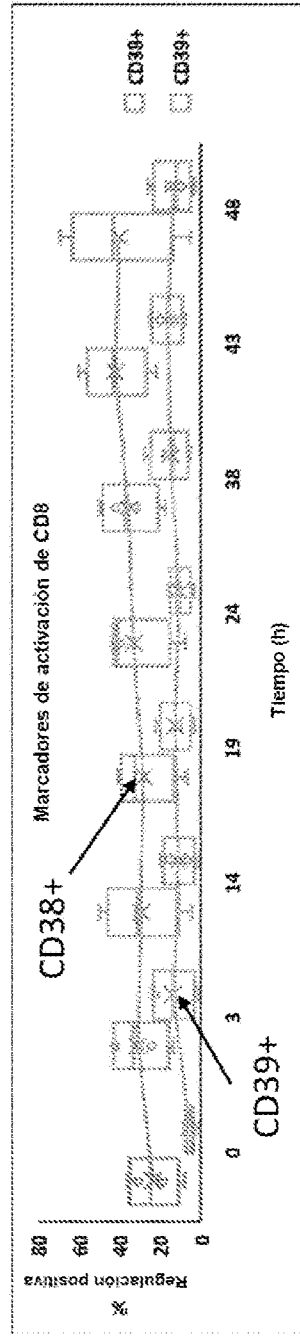


FIG. 12B

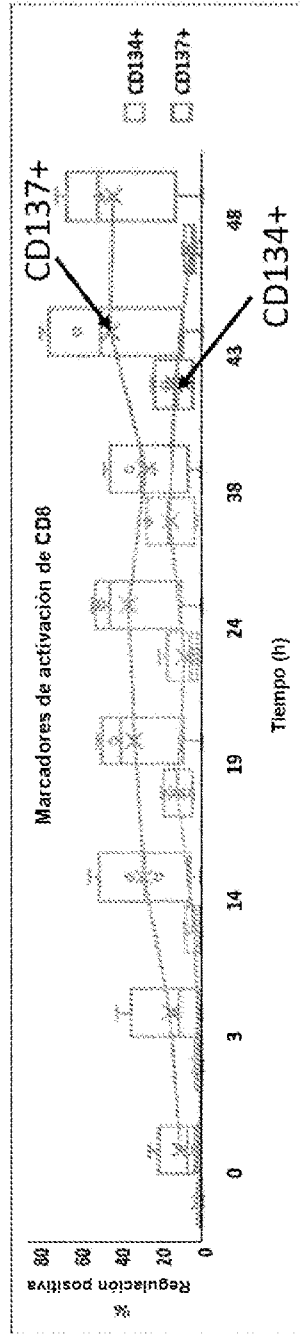


FIG. 12C

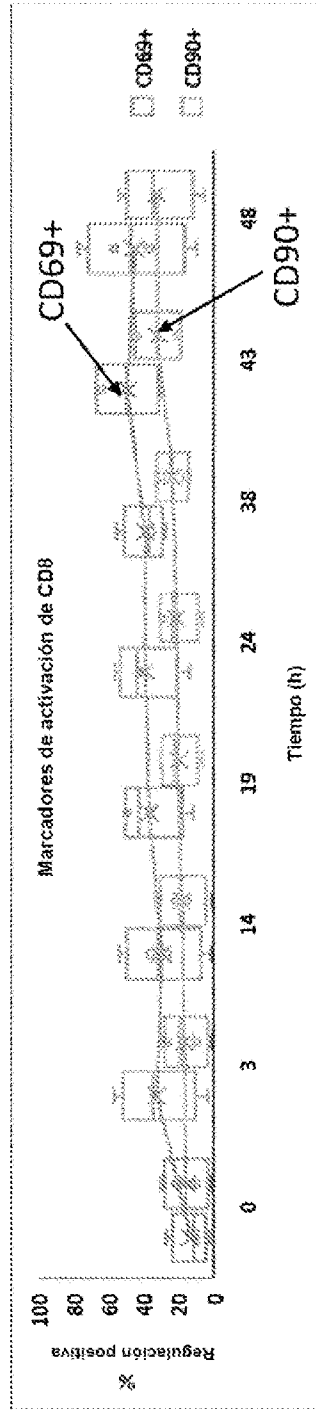


FIG. 13A

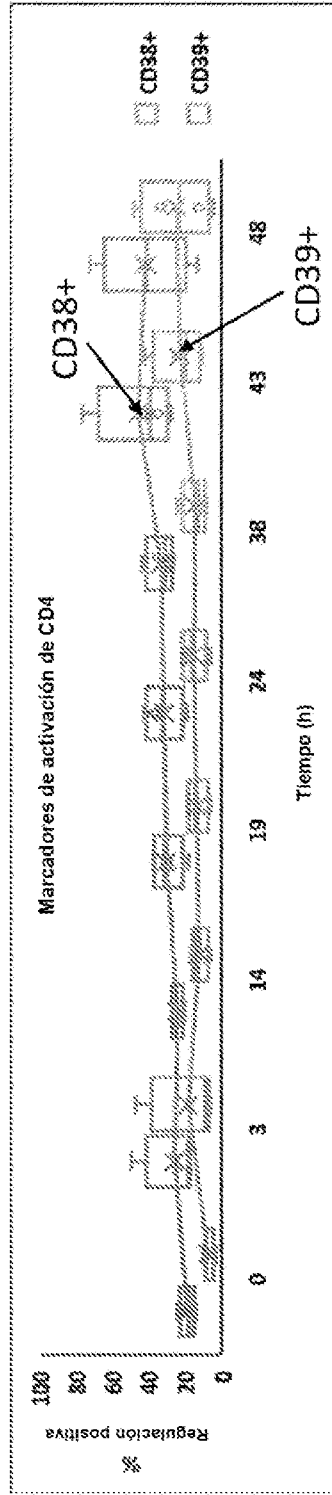


FIG. 13B

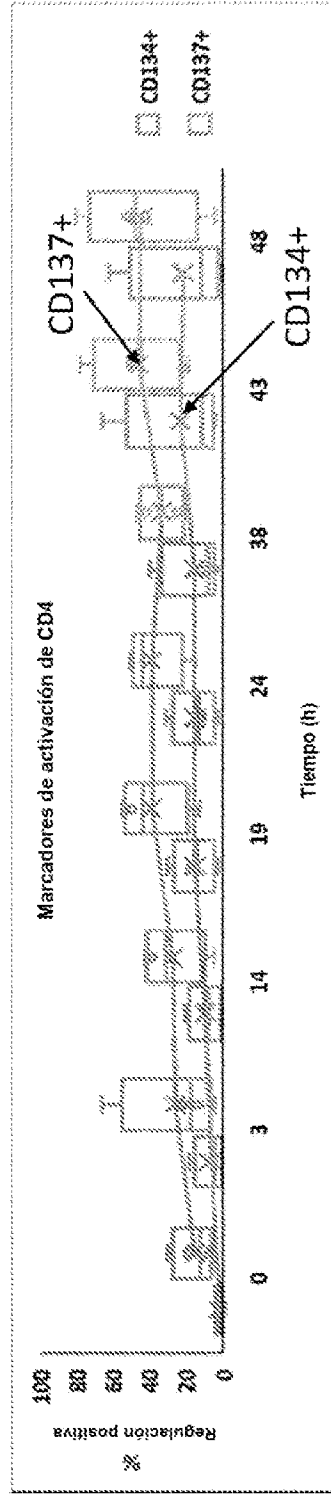
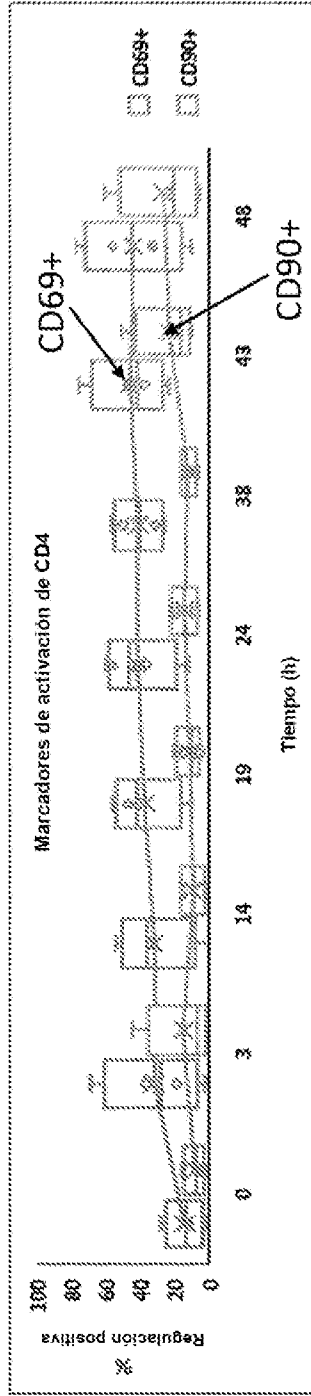


FIG. 13C



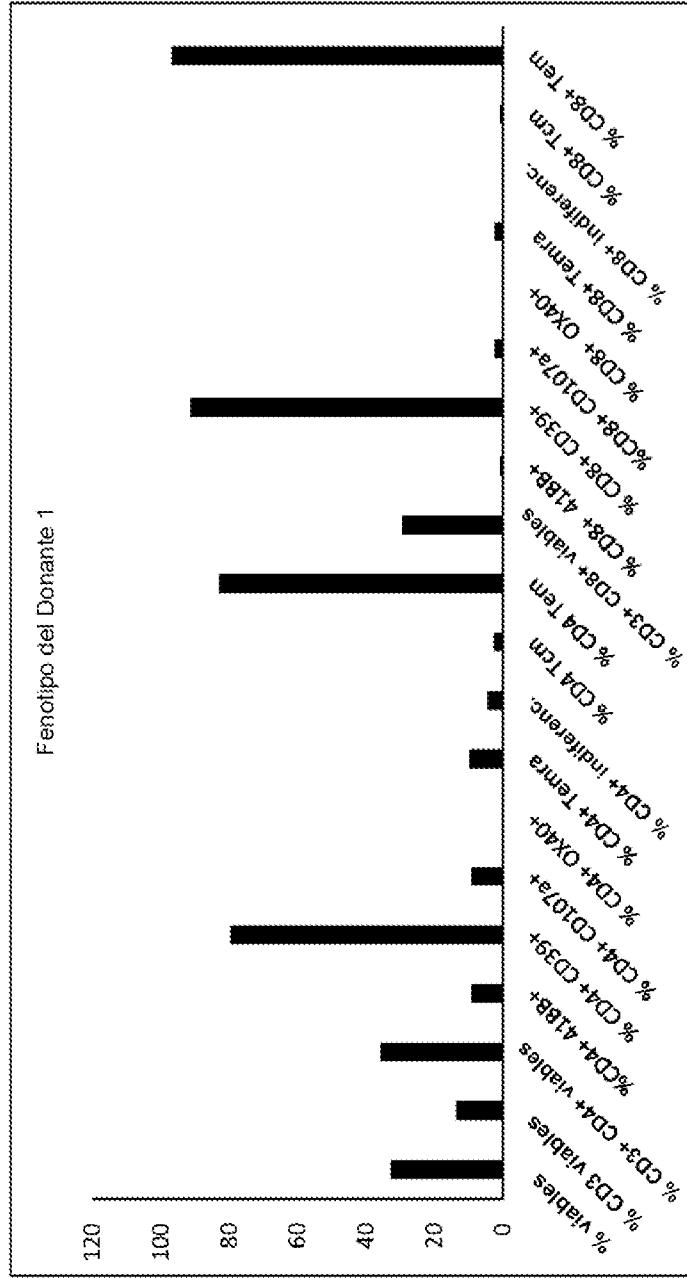


FIG. 14

FIG. 15A

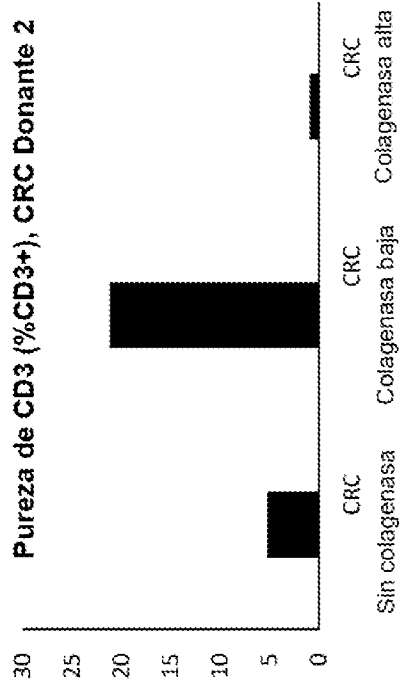


FIG. 15B

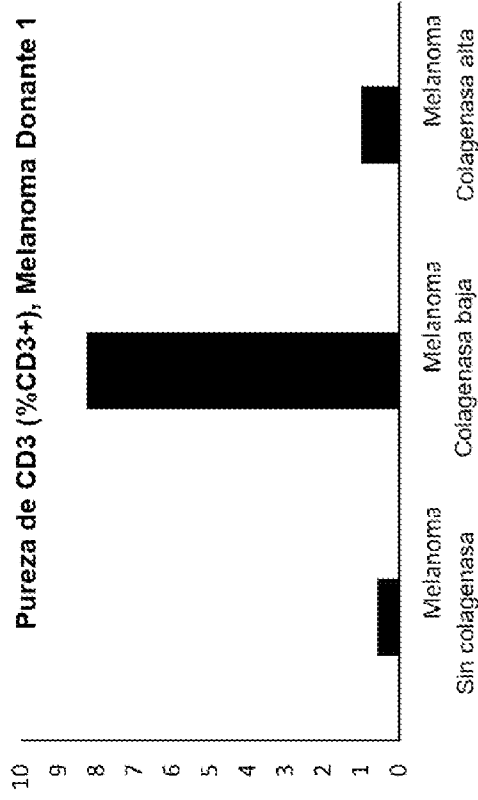


FIG. 15C

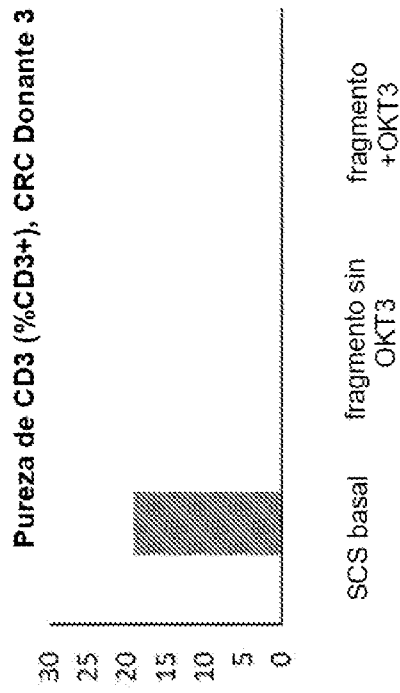


FIG. 15D

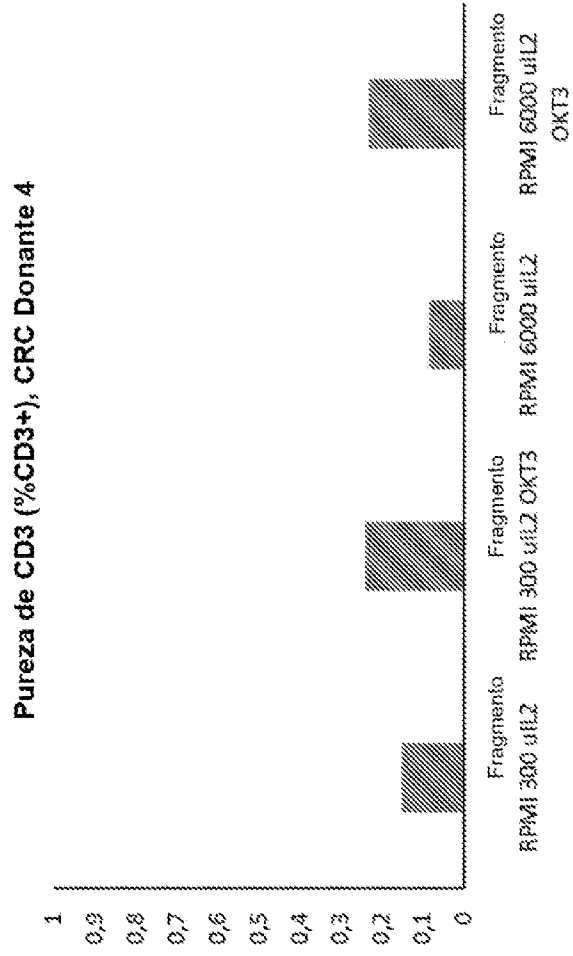


FIG. 15E

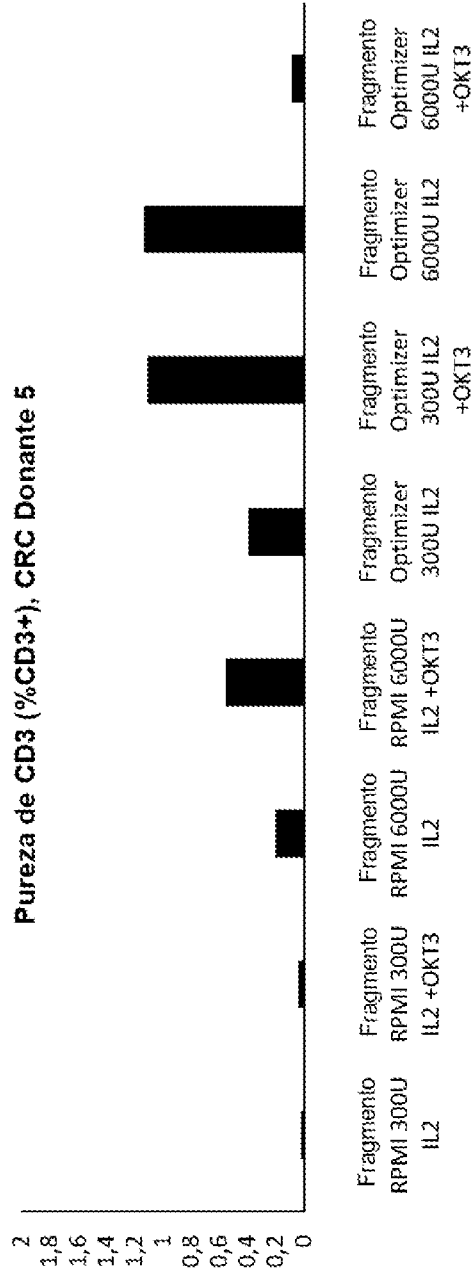


FIG. 16

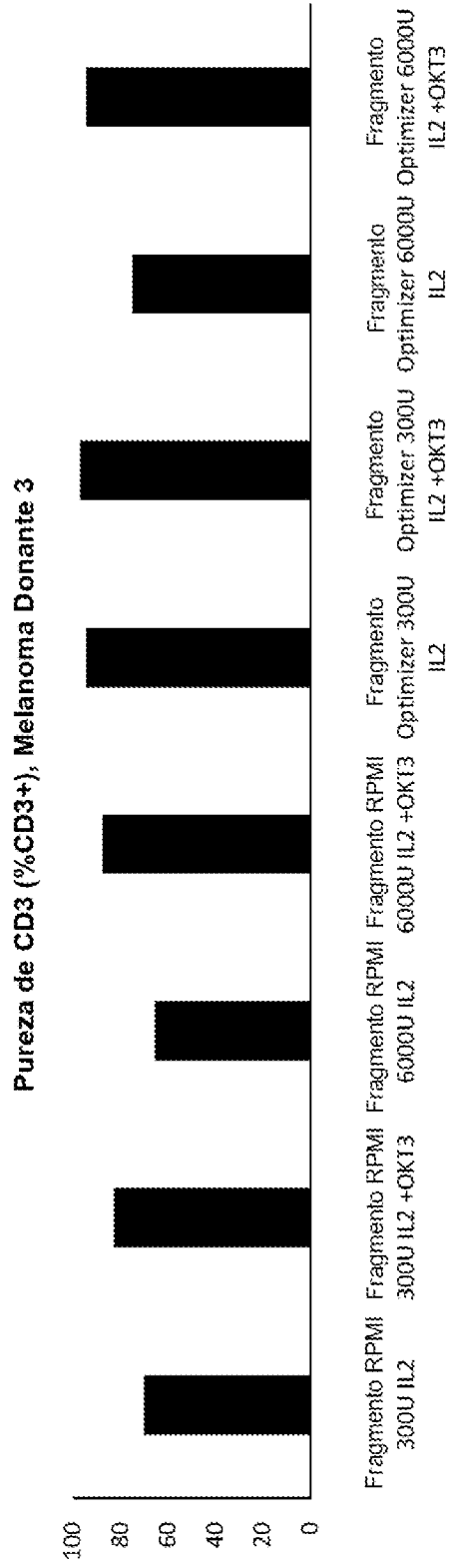


FIG. 17A

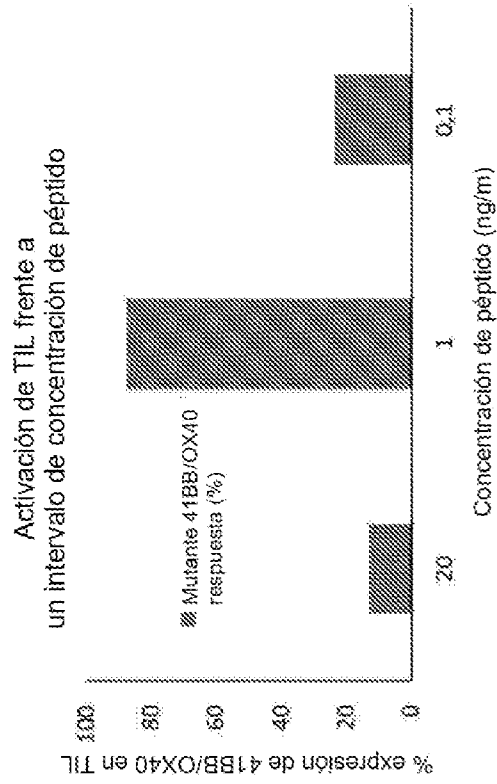


FIG. 17B

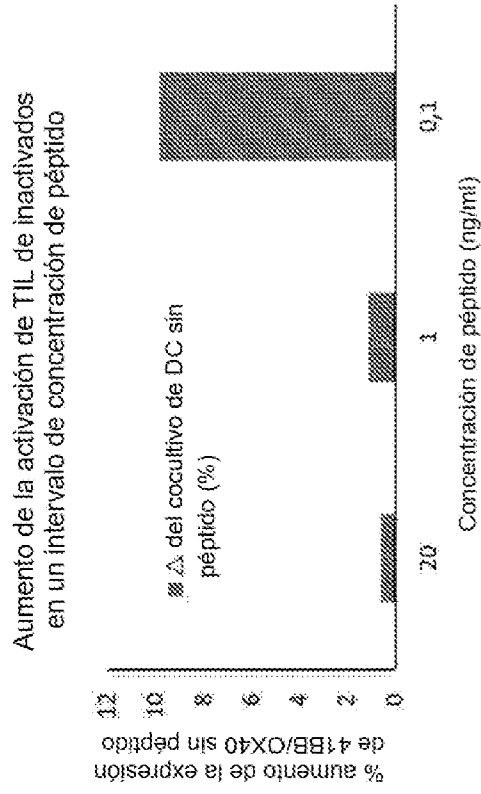


FIG. 18A

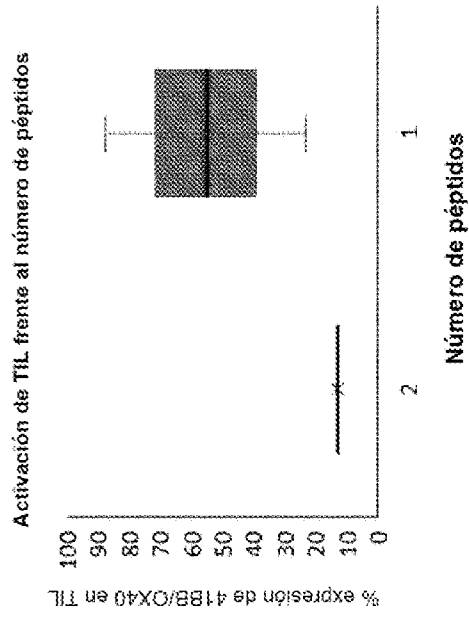


FIG. 18B

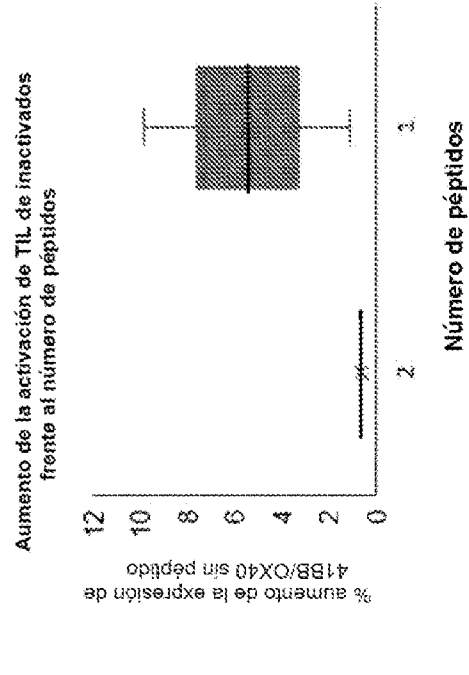


FIG. 19A

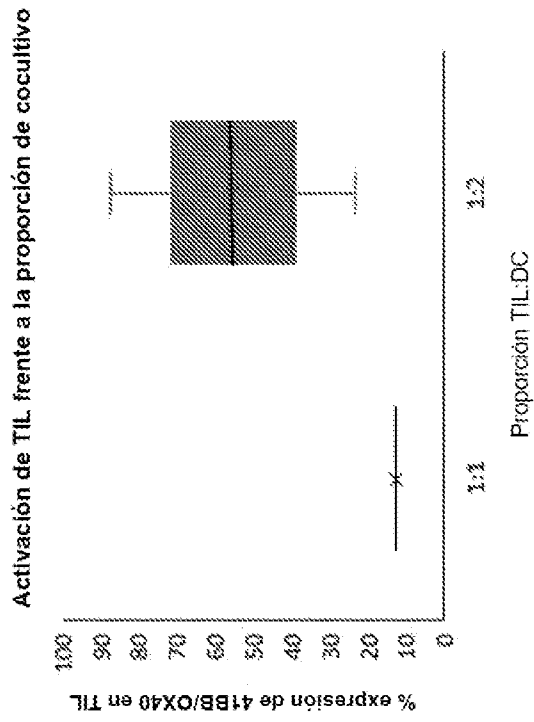


FIG. 19B

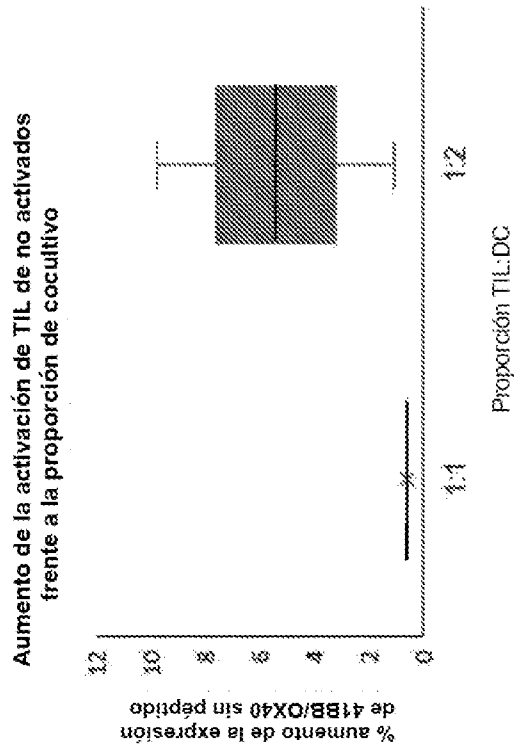


FIG. 20A

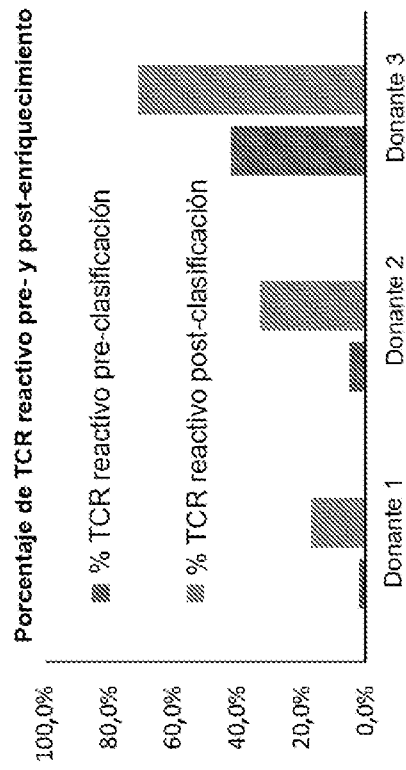


FIG. 20B

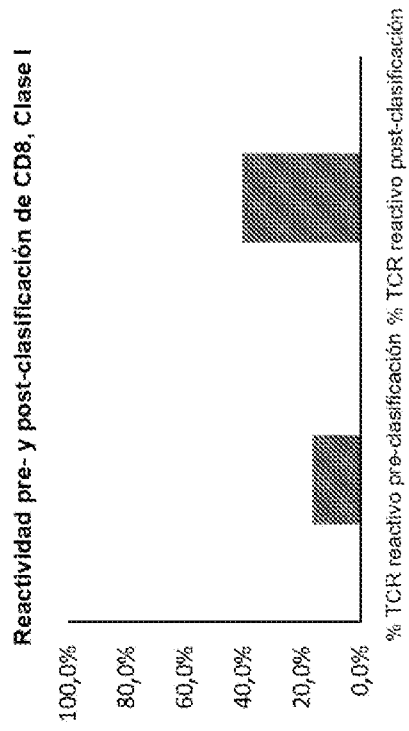
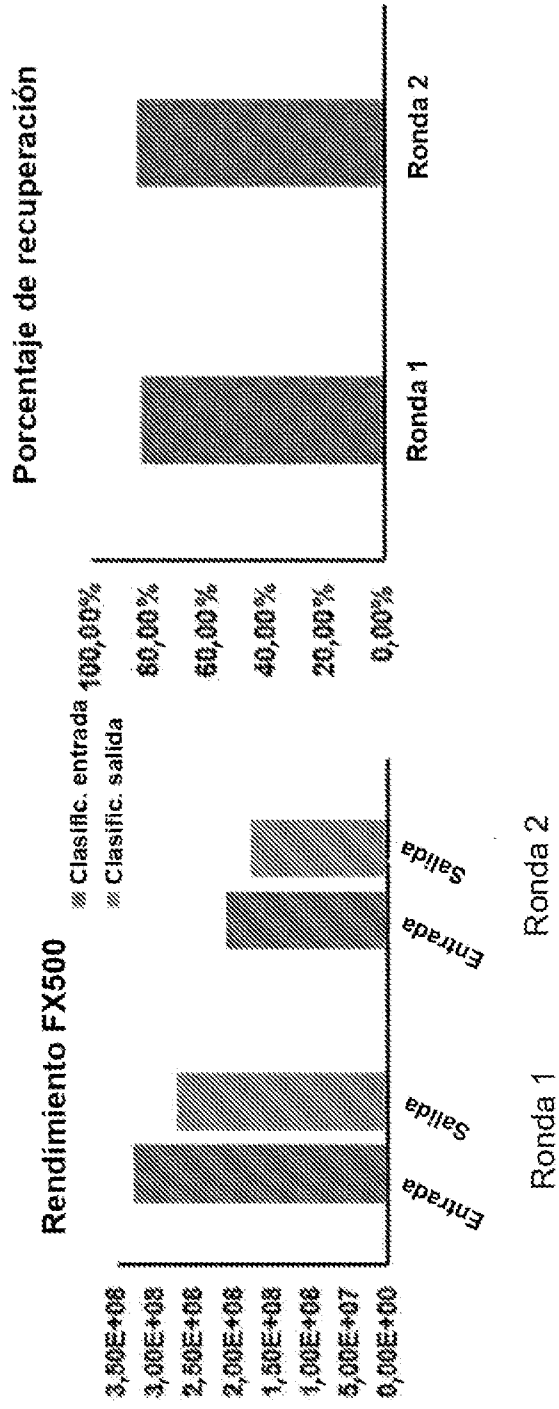


FIG. 21A

FIG. 21B



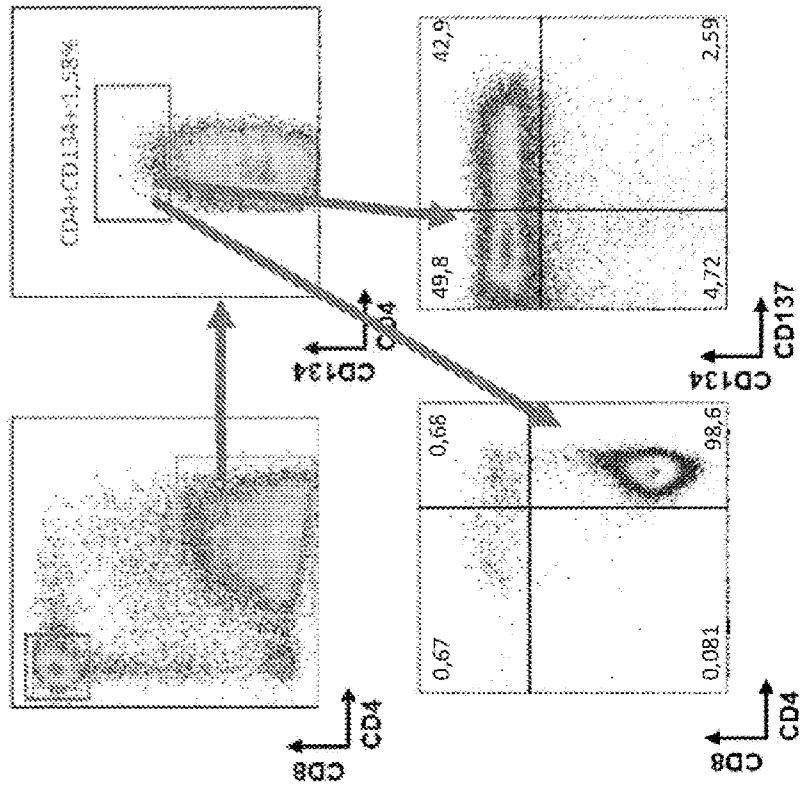


FIG. 22

FIG. 23A

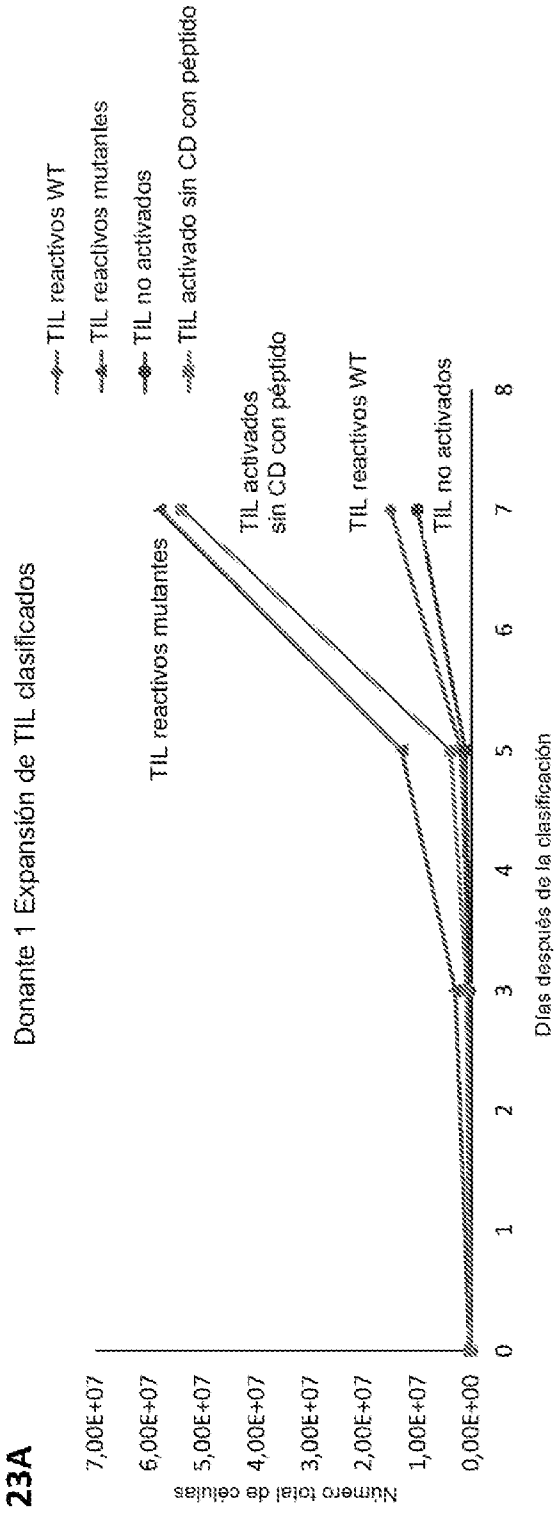


FIG. 23B

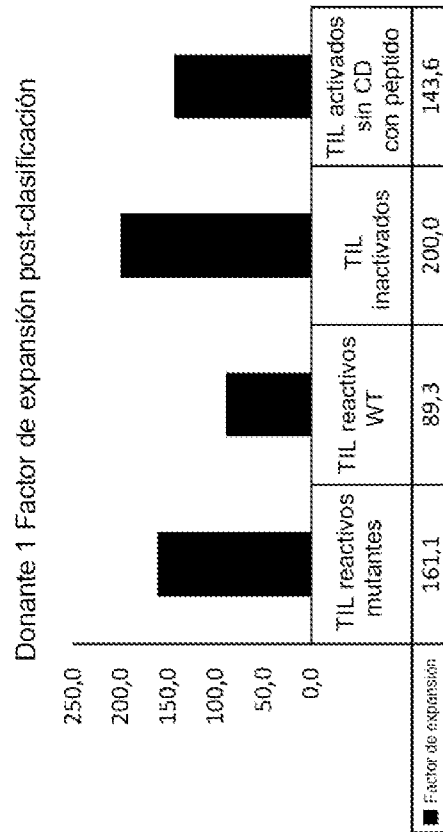


FIG. 23C

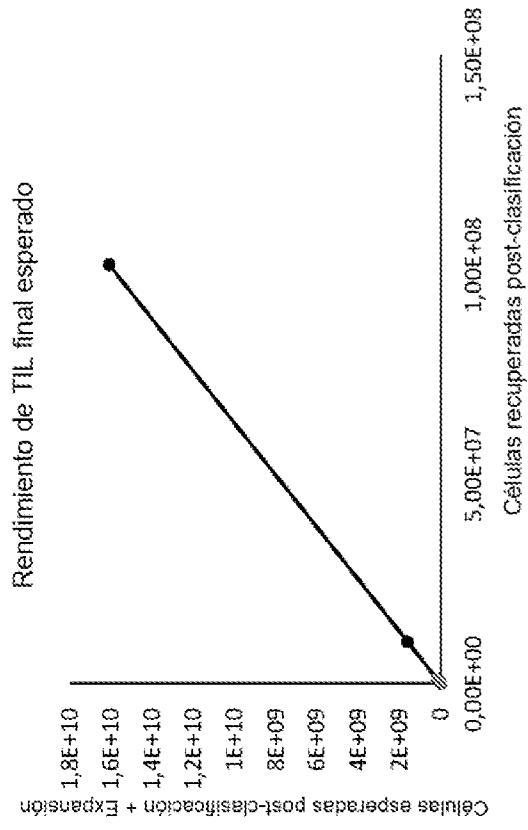


FIG. 24A

Muestra A Producción de IFNg por TIL

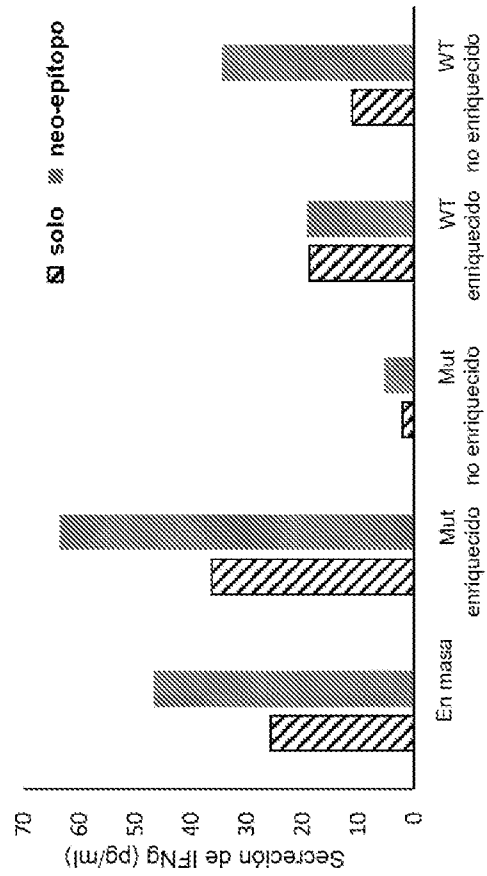


FIG. 24B

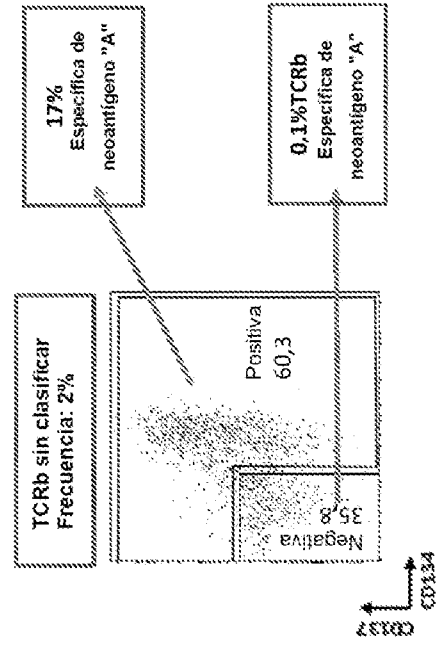


FIG. 24C

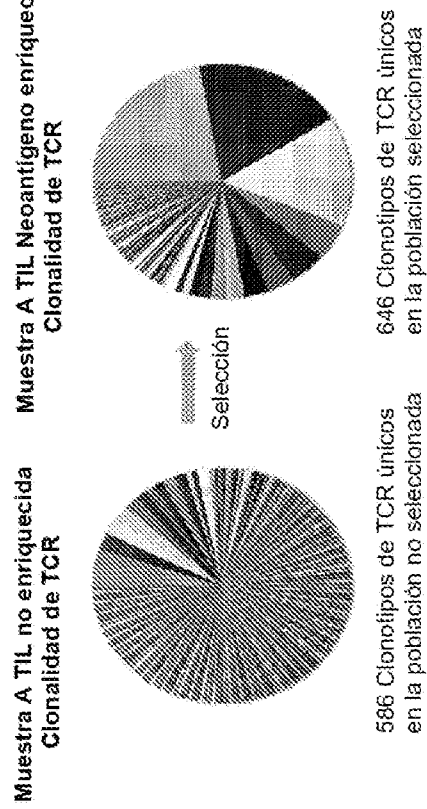


FIG. 24D

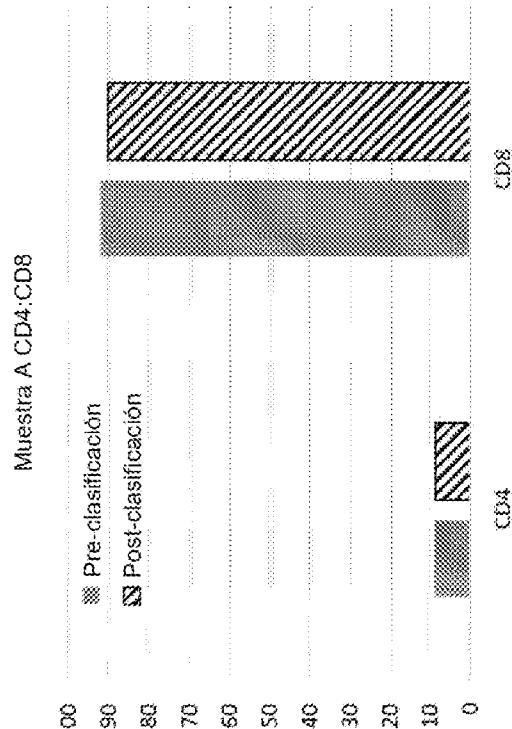


FIG. 25C

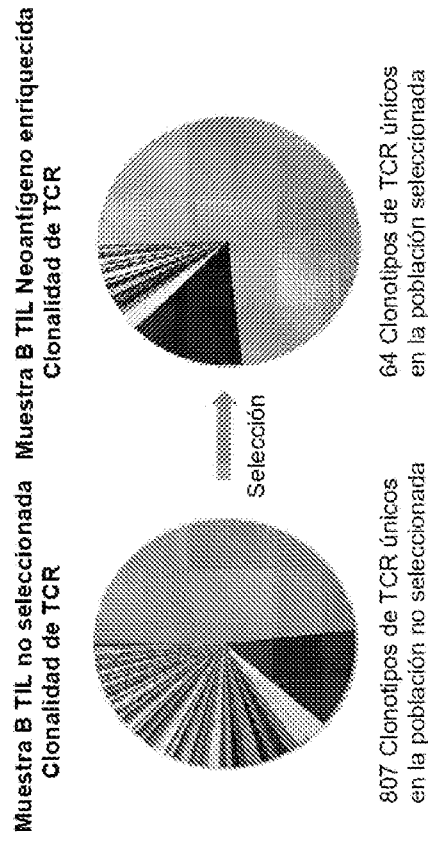


FIG. 25D

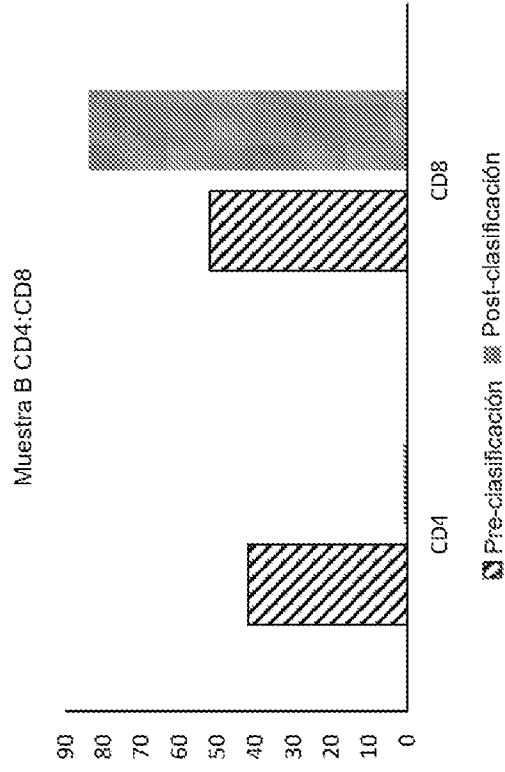


FIG. 26B

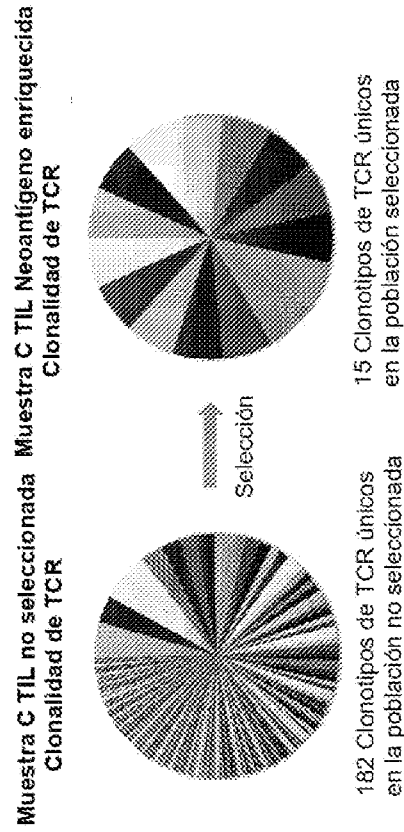
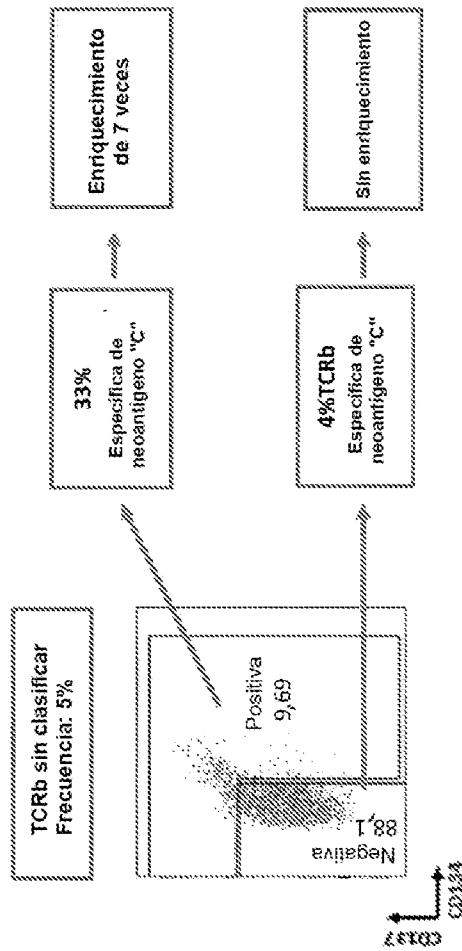


FIG. 26A



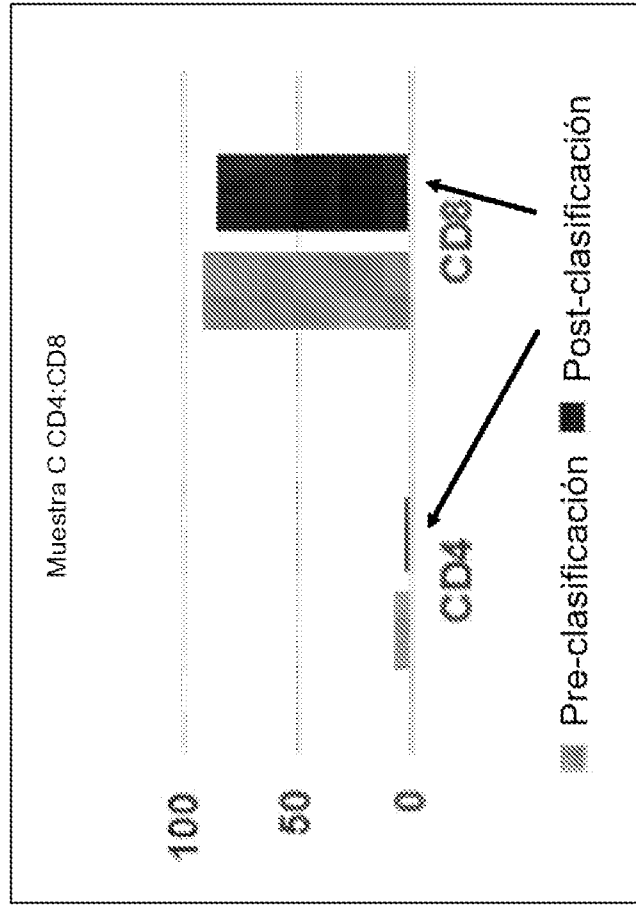


FIG. 26C