

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 777**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2020** **PCT/EP2020/087151**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2021** **WO21123255**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2020** **E 20838028 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024** **EP 4077640**

54 Título: **Proceso mejorado de cultivo de linfocitos infiltrantes de tumores para uso terapéutico**

30 Prioridad:

18.12.2019 EP 19217356

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2024

73 Titular/es:

CBIO A/S (100.0%)
Transformervej 8
2860 Søborg, DK

72 Inventor/es:

CORDES, ULRIK;
FRIESE, CHRISTINA;
KIRKETERP-MØLLER, NIKOLAJ y
HEEKE, CHRISTINA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 984 777 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

Proceso mejorado de cultivo de linfocitos infiltrantes de tumores para uso terapéutico

5 CAMPO

La presente invención está dirigida a revigorizar los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) agotados *in vitro* mediante el cocultivo de TIL extirpados que contienen fragmentos tumorales con estimuladores del microambiente tumoral (TME), como inhibidores del punto de control inmunitario (ICI), estimulando los TIL con otras interleucinas que se sabe que revierten el agotamiento de células T y/o inhibiendo el efecto de los factores secretados por las células T reguladoras (como la inhibición de la IL-10), creando de este modo un microambiente tumoral favorable en el que las células T agotadas pueden expandirse más rápidamente y en mayor número que en los protocolos de expansión de TIL actualmente establecidos.

15 ANTECEDENTES

Los linfocitos infiltrantes de tumores se asocian a un mejor pronóstico y supervivencia libre de progresión en pacientes con cáncer sometidos a inmunoterapia, como el uso de inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI) contra CTLA-4 y PD-1/PD-L1.

Sin embargo, todavía sólo una fracción de los pacientes tiene una respuesta duradera a largo plazo a tales terapias, ya que parecen estar implicados muchos otros factores en el microambiente tumoral en la regulación descendente de la respuesta inmunitaria. Uno de los factores clave parece ser el agotamiento de las células T, que provoca la eliminación física y/o la disfunción de las células T específicas de antígeno. Los factores implicados en este fenómeno de agotamiento son los marcadores de superficie expresados en las células tumorales, las células linfoides y mononucleares y las moléculas solubles secretadas por las células T reguladoras y las células NK en el microambiente tumoral (TME). Pero, además, la falta de factores estimuladores como el interferón gamma y la IL-2 es evidente en el TME.

La reversión del agotamiento de las células T es un objetivo clave en el desarrollo de nuevas clases de ICI, ya sea como monoterapia o en combinación con terapias ya establecidas. Sin embargo, como estos objetivos a menudo son también responsables de inducir tolerancia inmunitaria evitando respuestas autoinmunes, la administración sistémica de inhibidores puede provocar efectos secundarios graves. Además, la administración de moléculas estimuladoras de las células T, como la IL-2, también puede provocar efectos secundarios graves y, en ocasiones, mortales, por lo que debe ser gestionada por clínicos expertos. Se han adoptado algunos enfoques para administrar los fármacos candidatos localmente en el tumor, evitando de este modo posiblemente los efectos secundarios sistémicos. Sin embargo, como en muchos pacientes metastásicos las células cancerosas están distribuidas por todo el cuerpo, se puede cuestionar la probabilidad de éxito de este enfoque en tales circunstancias.

El uso de la terapia con linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) ha demostrado beneficios clínicos significativos, con tasas de respuesta objetiva de hasta el 55% y respuestas completas en hasta el 20% de los pacientes en varias enfermedades malignas, como el melanoma metastásico, el cáncer de cabeza y cuello y el cáncer de cuello uterino. En resumen, este tipo de terapia aprovecha la expansión *in vitro* de linfocitos T autólogos mediante la estimulación inicial de fragmentos del tumor extirpado con IL-2, anticuerpos anti-CD3 y células alimentadoras y, de este modo, hace crecer estas células hasta los miles de millones antes de volver a administrar las células T a los pacientes que han recibido la terapia de linfodepleción, donde después se promueve la regresión del tumor.

La terapia con TIL es costosa y requiere tiempo. Por lo tanto, sería ventajoso optimizar los métodos actuales e identificar formas de acortar la duración para la expansión de las TIL, aumentar la tasa de expansión y también lograr fenotipos más favorables.

SUMARIO

La presente invención se refiere a un método para promover la regresión de un cáncer en un mamífero expandiendo los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: (a) cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL de un tumor extirpado de un mamífero, (b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL en donde el uno o más estimuladores de TME comprende por lo menos una sustancia del grupo B seleccionada de una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab; (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de los TIL con IL-2 adicional, anticuerpos anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica; y (d) después de administrar quimioterapia linfodeplectora no mieloablativa, administrar al mamífero la población terapéutica de células T, en donde las células T administradas al mamífero, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para tratar a un sujeto con cáncer que comprende administrar linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos que comprende: (a) cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL a partir de un tumor extirpado de un mamífero, (b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de los TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL, en donde el uno o más estimuladores de TME comprende por lo menos una sustancia del grupo B seleccionada de una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab; (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de los TIL con IL-2 adicional, anticuerpos anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica; y (d) después de administrar quimioterapia linfodeplectora no mieloablativa, administrar al mamífero la población terapéutica de células T, donde las células T administradas al mamífero, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: (a) cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL a partir de un tumor extirpado de un mamífero (b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL, en donde el uno o más estimuladores de TME comprende por lo menos una sustancia del grupo B seleccionada de una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab; y (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de los TIL con IL-2 adicional, anticuerpos anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de los TIL es una población terapéutica.

En una o más realizaciones, el uno o más estimuladores de TME se seleccionan entre los grupos que consisten en: sustancias que son capaces de antagonizar y/o inhibir receptores expresados en células T (o sus ligandos) que se sabe que provocan regulación por disminución, desactivación y/o agotamiento de células T, sustancias que son capaces de agonizar y/o estimular receptores expresados en células T que se sabe que provocan regulación por aumento, activación, y/o revigorización, sustancias capaces de antagonizar y/o inhibir moléculas solubles y citoquinas y sus receptores que se sabe que provocan la regulación por disminución, desactivación y/o agotamiento de las células T, y sustancias capaces de regular por disminución y/o agotar las células T reguladoras, favoreciendo de este modo la expansión ex vivo de las células T.

En una o más realizaciones, el uno o más estimuladores de TME es/son uno o más inhibidores de puntos de control o inhibidores de sus ligandos como anti-PD1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-CTLA-4, anti-LAG3, anti-A2AR, anti-B7-H3, anti B7-H4, anti-BTLA, anti-IDO, anti-HVEM, anti-IDO, anti-TDO, anti-KIR, anti-NOX2, anti-TIM3, anti-galectina-9, anti-VISTA, anti-SIGLEC7/9, y en donde también se añaden opcionalmente a la segunda expansión el uno o más inhibidores de puntos de control o inhibidores de sus ligandos.

En una o más realizaciones, las sustancias capaces de antagonizar y/o inhibir los receptores expresados en las células T (o sus ligandos) que se sabe que provocan la regulación por disminución, la desactivación y/o el agotamiento de las células T se seleccionan entre los grupos que consisten en: A: sustancias que actúan a través del receptor PD-1 en células T, B: sustancias que actúan a través del receptor CTLA-4 en células T, C: sustancias que actúan a través del receptor LAG-3 en células T, D: sustancias que actúan a través del receptor TIGIT/CD226 en células T, E: sustancias que actúan a través del receptor KIR en células T, F: sustancias que actúan a través del receptor TIM-3 en células T, G: sustancias que actúan a través del receptor BTLA en células T, y H: sustancias que actúan a través del receptor A2aR en células T.

En una o más realizaciones, la sustancia del grupo A se selecciona entre una o más del grupo que consiste en pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab, sym021, atezolizumab, avelumab y durvalumab.

En una o más realizaciones, la sustancia del grupo B se selecciona entre una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo C se selecciona entre una o más del grupo que consiste en relatlimab, eftilagimo alfa y sym022. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo D es tiragolumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo E es lirilumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo F es sym023. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo G es 40E4 y PJ196.

En una o más realizaciones, las sustancias que son capaces de agonizar y/o estimular los receptores expresados en las células T que se sabe que provocan la regulación por incremento, la activación y/o la revigorización de las células T se seleccionan de los grupos que consisten en: I: sustancias que actúan a través del receptor OX40/CD134 en células T, J: sustancias que actúan a través del receptor 4-1 BB/CD137 en células T, K: sustancias que actúan a través del receptor CD28 en células T, L: sustancias que actúan a través del receptor ICOS en células T, M: sustancias que actúan a través del receptor GITR en células T, N: sustancias que actúan a través del receptor CD40L en células T, y O: sustancias que actúan a través del receptor CD27 en células T.

En una o más realizaciones, la sustancia del grupo J se selecciona entre una o más del grupo que consiste en urelumab y utomilumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo K es el teralizumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo O es valilumab.

En una o más realizaciones, las sustancias que son capaces de antagonizar y/o inhibir moléculas solubles y citoquinas y sus receptores que se sabe que provocan la regulación por disminución, desactivación y/o agotamiento de las células T se seleccionan entre los grupos que consisten en: P: sustancias que actúan a través del receptor IDO1/2 en células T, Q: sustancias que actúan a través del receptor TGF β en células T, R: sustancias que actúan a través del receptor IL-10 en células T, y S: sustancias que actúan a través del receptor IL-35 en células T.

En una o más realizaciones, la sustancia del grupo P es epacadostat. En una o varias realizaciones, la sustancia del grupo Q es linrodostat. En una o varias realizaciones, la sustancia del grupo R es galunisertib.

En una o más realizaciones, las sustancias que son capaces de regular por disminución y/o agotar las células T reguladoras favoreciendo de este modo la expansión ex vivo de células T se seleccionan entre los grupos que consisten en: T: ciclofosfamidias, U: TKIs, V: sustancias que actúan a través de α CD25, y X: fusiones de IL2/toxina diftérica.

En una o más realizaciones, la sustancia del grupo U es sunitinib. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo V se selecciona entre una o más del grupo que consiste en sorafenib, imatinib y daclizumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo X es dinileukina diftiox.

En una o más realizaciones, la concentración de la sustancia en es de 0,1 μ g/ml a 300 μ g/ml, como de 1 μ g/ml a 100 μ g/ml, como de 10 μ g/ml a 100 μ g/ml, como de 1 μ g/ml a 10 μ g/ml.

En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar un tipo de cáncer seleccionado de los grupos que consisten en: 1: tumores sólidos, 2: tumores sin tratamiento de ICI, 3: tumores MSI-H, 4: tumores hematológicos, tumores inducidos por virus, y 5: tumores hipermutados (como tumores mutados POL-E y POL-D).

En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar un tipo de cáncer seleccionado de los grupos que consisten en cáncer de mama, cáncer de células renales, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer de cuello uterino, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, linfoma de Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de hígado y sarcomas.

En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar un cáncer de mama. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de células renales. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de vejiga. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el melanoma. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de cuello uterino. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer gástrico. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer colorrectal. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de pulmón. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de cabeza y cuello. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de ovario. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el linfoma de Hodgkin. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de páncreas. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de hígado. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar sarcomas.

En una o más realizaciones, los pasos (a) a (c) o (d) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 días. En una o más realizaciones, los pasos (a) a (c) o (d) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 días. En una o más realizaciones, los pasos (a) a (c) o (d) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 25 días a aproximadamente 40 días. En una o más realizaciones, los pasos (a) a (c) o (d) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 30 días a aproximadamente 40 días. En una o más realizaciones, los pasos (a) a (b) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 10 días a aproximadamente 28 días. En una o más realizaciones, los pasos (a) a (b) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 10 días a aproximadamente 20 días.

En una o más realizaciones, el paso (c) se lleva a cabo en el plazo de un periodo de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 días. En una o más realizaciones, el paso (c) se lleva a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 10 a aproximadamente 28 días. En una o más realizaciones, el paso (c) se lleva a cabo en el plazo de un periodo de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 días. En una o más realizaciones, el paso (c) se lleva a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 12 días a aproximadamente 18 días.

- En una o más realizaciones, el paso (b) da como resultado de 1×10^6 a 1×10^7 células, como de 2×10^6 a 5×10^6 células. En una o más realizaciones, el paso (b) da como resultado de 5×10^6 a 1×10^7 células. En una o más realizaciones, el paso (b) da como resultado de 1×10^6 a 5×10^7 células. En una o más realizaciones, el paso (b) da como resultado de 1×10^7 a 5×10^7 células. En una o más realizaciones, el paso (c) da como resultado de 1×10^7 a 1×10^{12} células, como de 1×10^8 a 5×10^9 células, como de 1×10^9 a 5×10^9 células, como de 1×10^8 a 5×10^{10} células, como de 1×10^9 a 5×10^{11} células. En una o más realizaciones, el paso (c) da como resultado de 1×10^7 a 1×10^{10} células. En una o más realizaciones, el paso (c) da como resultado de 1×10^7 a 1×10^9 células. En una o más realizaciones, el paso (c) da como resultado de 1×10^7 a 1×10^8 células.
- En una o más realizaciones, las APC son APC artificiales (aAPC) o células alimentadoras alogénicas.
- En una o más realizaciones, se infunde en un paciente la población terapéutica de los TIL.
- En una o más realizaciones, las células se extraen del cultivo celular y se crioconservan en un medio de almacenamiento antes de realizar el paso (c).
- En una o más realizaciones, el método comprende además el paso de transducir la primera población de los TIL con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un anticuerpo de fragmento variable de cadena sencilla fusionado con por lo menos un endodominio de una molécula de señalización de células T.
- En una o más realizaciones, el paso (c) comprende además un paso de extracción de las células del medio de cultivo celular.
- En una o más realizaciones, el paso (a) comprende además procesar el tumor extirpado en múltiples fragmentos tumorales, como de 4 a 50 fragmentos, como de 20 a 30 fragmentos.
- En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $5 \text{ a } 50 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente 50 mm^3 . En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $0,1 \text{ a } 10 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $0,1 \text{ a } 1 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $0,5 \text{ a } 5 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $1 \text{ a } 10 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $1 \text{ a } 3 \text{ mm}^3$.
- En una o más realizaciones, el mamífero es un humano.
- En una o más realizaciones, el medio de cultivo celular se suministra en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un recipiente G-Rex y una bolsa celular Xuri.
- Un aspecto se refiere a una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que puede obtenerse mediante un método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- Un aspecto adicional se refiere a linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer, el tratamiento comprendiendo los pasos de: cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL a partir de un tumor extirpado de un mamífero; realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL; realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2 adicional, anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica; y después de administrar quimioterapia linfodeplectora no mieloablativa, administrar al mamífero la población terapéutica de células T, en donde las células T administradas al mamífero, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero.
- Park Junsik et al., Clinical cancer research, 18 de enero de 2019 divulga el estado diferencial de los linfocitos CD8 infiltrantes de tumores (TIL) de pacientes con glioblastoma (GBM) recurrente primario. Los TIL se estimularon ex vivo con anti-CD3/OKT3 e interleucinas (IL-2, IL-7, IL-15) en presencia de anti-PD-1 y/o antígeno 4 de linfocitos T anticitotóxicos (CTLA-4).
- Maclea hall et al., Journal for immunotherapy of cancer, vol. 4, Nº 1, 18 de octubre de 2016, páginas 1-12 describen la expansión de TIL a partir de tumores pancreáticos humanos. Se probaron el bloqueo de PD-1 y la estimulación con 4-1BB.
- La WO 2018/075664 muestra conocimientos generales en el campo de los protocolos de expansión de TIL.
- Jessica Ann Cacon et al., Oncoimmunology, vol. 4, Nº 12, 1 de julio de 2015 es un artículo de revisión sobre

el ACT que usa TIL como tratamiento para el melanoma.

Friese Christina et al., Scientific reports, vol. 10, Nº 1, 3 de marzo de 2020 describe que los TIL autólogos pueden expandirse directamente mediante la manipulación de vías, incluyendo el uso de CTLA-4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención está dirigida a revigorizar los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) agotados *in vitro* mediante el cocultivo de TIL extirpados que contienen fragmentos tumorales con, por ejemplo, inhibidores del punto de control, estimulando los TIL con otras interleucinas que se sabe que revierten el agotamiento de las células T, y/o inhibiendo el efecto de los factores secretados por las células T reguladoras (como la IL-10), creando de este modo un TME favorable en el que las células T agotadas pueden expandirse más rápidamente y en mayor número que en los protocolos de expansión de TIL actualmente establecidos.

Este enfoque es posiblemente ventajoso para las terapias administradas sistémicamente, ya que la estimulación *in vitro* puede realizarse usando niveles de dosis que son mucho más altos de lo que se toleraría *in vivo*. Por ejemplo, los protocolos actuales de TIL utilizan IL-2 a una concentración de entre 3.000 y 6.000 IU por ml, que es entre 5 y 10 veces más alta que la dosis recomendada sistémicamente.

Además, como las células T que tienen una mayor afinidad por los antígenos tumorales podrían tener una mayor tendencia a agotarse, la reinvigoración *in vitro* dirigida podría ayudar a expandir clones de células T de mayor afinidad que puedan dirigirse de manera más agresiva al tumor en el que residen, llevando finalmente de esta manera a un mejor resultado clínico de este novedoso enfoque de la terapia TIL.

Por tanto, la presente invención se refiere a un método para promover la regresión de un cáncer en un mamífero mediante la expansión de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: (a) cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL de un tumor extirpado de un mamífero, (b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL, en donde el uno o más estimuladores de TME comprende por lo menos una sustancia del grupo B seleccionada de una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab; (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2 adicional, anticuerpo anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica; y (d) después de administrar quimioterapia linfodeplectora no mieloablativa, administrar al mamífero la población terapéutica de células T, en donde las células T administradas al mamífero, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero.

Por "linfocitos infiltrantes de tumores" o "TIL" se entiende una población de células obtenidas originalmente como glóbulos blancos que han abandonado el torrente sanguíneo de un sujeto y han migrado a un tumor. Los TIL incluyen, entre otros, células T citotóxicas CD8+ (linfocitos), células T CD4+ Th1 y Th17 (células auxiliares CD4+), células asesinas naturales, células dendríticas y macrófagos M1. Los TIL incluyen tanto TIL primarios como secundarios. Los "TIL primarios" son los que se obtienen de muestras de tejido del paciente como se describe en la presente (a veces denominados "recién recogidos"), y los "TIL secundarios" son cualquier población de células TIL que se haya expandido o proliferado como se analiza en la presente. Por lo general, los TIL pueden definirse o bioquímicamente, usando marcadores de superficie celular, o funcionalmente, por su capacidad para infiltrarse en tumores y efectuar el tratamiento. Los TIL pueden clasificarse generalmente por la expresión de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 y CD25. Además, y alternativamente, los TIL pueden definirse funcionalmente por su capacidad para infiltrarse en tumores sólidos tras su reintroducción en un paciente. Los TIL pueden caracterizarse además por su potencia; por ejemplo, los TIL pueden considerarse potentes si, por ejemplo, la liberación de interferón (IFN) es mayor de aproximadamente 50 pg/ml, mayor de aproximadamente 100 pg/ml, mayor de aproximadamente 150 pg/ml o mayor de aproximadamente 200 pg/ml.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para tratar a un sujeto con cáncer que comprende administrar linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) expandidos que comprende: (a) cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL a partir de un tumor extirpado de un mamífero, (b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL, en donde el uno o más estimuladores de TME comprende por lo menos una sustancia del grupo B seleccionada de una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab; (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2 adicional, anticuerpo anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica; y (d) después de administrar quimioterapia linfodeplectora no mieloablativa, administrar al mamífero la población terapéutica de células T, en donde las células T administradas al mamífero, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero.

Los términos "tratamiento", "que trata", "tratar" y similares se refieren a la obtención de un efecto

farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curación parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en la presente, abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a padecerla pero que aún no se le ha diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo o progresión; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad y/o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad. Se entiende que "tratamiento" también abarca la administración de un agente para proporcionar un efecto farmacológico, incluso en ausencia de una enfermedad o afección. Por ejemplo, "tratamiento" abarca la administración de una composición que puede provocar una respuesta inmunitaria o conferir inmunidad en ausencia de un estado de enfermedad, por ejemplo, en el caso de una vacuna.

El término "anticuerpo anti-CD3" se refiere a un anticuerpo o variante del mismo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal e incluye anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o murinos que se dirigen contra el receptor CD3 del receptor de antígenos de células T maduras. 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, oteixizumab, teplizumab y visilizumab. En una realización, el medio de cultivo celular comprende el anticuerpo OKT3. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 30 ng/ml de anticuerpo 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 pg/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. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular no comprende anticuerpo OKT3.

El término "IL-2" (también denominado en la presente "IL2") se refiere al factor de crecimiento de células T conocido como interleucina-2, e incluye todas las formas de IL-2, incluyendo las formas humanas y de mamíferos, las sustituciones conservadoras de aminoácidos, las glicoformas, los biosimilares y variantes de los mismos.

Después de la preparación de los fragmentos tumorales, las células resultantes (es decir, los fragmentos) se cultivan en medios que contienen IL-2 en condiciones que favorecen el crecimiento de los TIL frente a las células tumorales y otras. En algunas realizaciones, los digeridos tumorales se incuban en pocillos de 2 ml en medios que comprenden suero AB humano inactivado (o, en algunos casos, como se describe en la presente, en presencia de una población celular de aAPC) con 6000 IU/ml de IL-2. Esta población celular primaria se cultiva durante un periodo de días, generalmente de 6 a 14 días, dando como resultado una población de TIL a granel, generalmente de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^8 células TIL a granel. En algunas realizaciones, el medio de crecimiento durante la primera expansión comprende IL-2 o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la IL es IL-2 humana recombinante (rhIL-2). En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de $20\text{-}30 \times 10^6$ IU/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 20×10^6 IU/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 25×10^6 IU/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 30×10^6 IU/mg para un vial de 1 mg. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una concentración final de $4\text{-}8 \times 10^6$ IU/mg de IL-2. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una concentración final de $5\text{-}7 \times 10^6$ IU/mg de IL-2. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 tiene una concentración final de 6×10^6 IU/mg de IL-2. En algunas realizaciones, la solución madre de IL-2 se prepara como se describe en los ejemplos. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 10.000 IU/ml de IL-2, aproximadamente 9.000 IU/ml de IL-2, aproximadamente 8.000 IU/ml de IL-2, aproximadamente 7.000 IU/ml de IL-2, aproximadamente 6.000 IU/ml de IL-2 o aproximadamente 5.000 IU/ml de IL-2. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 9.000 IU/ml de IL-2 a aproximadamente 5.000 IU/ml de IL-2. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 8.000 IU/ml de IL-2 a aproximadamente 6.000 IU/ml de IL-2. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 7.000 IU/ml de IL-2 a aproximadamente 6.000 IU/ml de IL-2. En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 6.000 IU/ml de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 3000 IU/ml de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En una realización preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 3000 IU/ml de IL-2. En una realización, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1000 IU/ml, aproximadamente 1500 IU/ml, aproximadamente 2000 IU/ml, aproximadamente 2500 IU/ml, aproximadamente 3000 IU/ml, aproximadamente 3500 IU/ml, aproximadamente 4000 IU/ml, aproximadamente 4500 IU/ml, aproximadamente 5000 IU/ml, aproximadamente 5500 IU/ml, aproximadamente 6000 IU/ml, aproximadamente 6500 IU/ml, aproximadamente 7000 IU/ml, aproximadamente 7500 IU/ml, o aproximadamente 8000 IU/ml de IL-2. En

una realización, el medio de cultivo celular comprende entre 1000 y 2000 IU/ml, entre 2000 y 3000 IU/ml, entre 3000 y 4000 IU/ml, entre 4000 y 5000 IU/ml, entre 5000 y 6000 IU/ml, entre 6000 y 7000 IU/ml, entre 7000 y 8000 IU/ml, o unas 8000 IU/ml de IL-2.

También pueden añadirse IL-4, IL-7, IL-15 y/o IL-21 a los pasos (b) y/o (c) de los presentes métodos. El término "IL-4" (también denominado en la presente "IL4") se refiere a la citoquina conocida como interleucina 4, producida por células T Th2 y por eosinófilos, basófilos y mastocitos. La IL-4 regula la diferenciación de las células T ayudantes vírgenes (células Th0) a células T Th2. El término "IL-7" (también denominado en la presente "IL7") se refiere a una citoquina glicosilada derivada de tejidos conocida como interleucina 7, que puede obtenerse de células estromales y epiteliales, así como de células dendríticas. El término "IL-15" (también denominado en la presente "IL15") se refiere al factor de crecimiento de células T conocido como interleucina 15, e incluye todas las formas de IL-2, incluyendo las formas humanas y de mamíferos, las sustituciones conservadoras de aminoácidos, las glicoformas, los biosimilares y variantes de los mismos. El término "IL-21" (también denominado en la presente "IL21") se refiere a la proteína citoquina pleiotrópica conocida como interleucina-21, e incluye todas las formas de IL-21, incluyendo las formas humanas y de mamíferos, las sustituciones conservadoras de aminoácidos, las glicoformas, los biosimilares y las variantes de los mismos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en una población terapéutica de los TIL que comprende: (a) cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL de un tumor extirpado de un mamífero (b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de los TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL; y (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2 adicional, anticuerpo anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de los TIL es una población terapéutica.

Los descubrimientos experimentales indican que la linfodepleción previa a la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de tumores desempeña un papel clave en la mejora de la eficacia del tratamiento mediante la eliminación de células T reguladoras y elementos competidores del sistema inmunitario ("sumideros de citoquinas"). Por consiguiente, algunas realizaciones de la invención utilizan un paso de linfodepleción (a veces también denominado "acondicionamiento inmunosupresor") en el paciente antes de la introducción de los TIL de la invención.

Los métodos de la presente invención, desde el paso (a) hasta el paso (c), pueden realizarse en un sistema cerrado. El término "sistema cerrado" se refiere a un sistema que está cerrado al entorno exterior. Con los métodos de la presente invención puede emplearse cualquier sistema cerrado apropiado para métodos de cultivo celular. Los sistemas cerrados incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a los recipientes G cerrados. Una vez que se añade un segmento tumoral al sistema cerrado, el sistema no se abre al entorno exterior hasta que los TIL estén listos para ser administrados al paciente.

El término "estimuladores del TME" se refiere a sustancias (o agentes) que tienen la capacidad de crear un microambiente favorable dentro del tumor en el que las células T agotadas pueden revigorizarse para expandirse varias veces y restaurar su funcionalidad antitumoral. Por tanto, en una o más realizaciones, el uno o más estimuladores de TME se seleccionan de los grupos que consisten en: (x) una o más sustancias que son capaces de antagonizar y/o inhibir receptores expresados en células T (o sus ligandos) que se sabe que provocan la regulación por disminución, desactivación y/o agotamiento de células T, (y) una o más sustancias que son capaces de agonizar y/o estimular receptores expresados en células T que se sabe que provocan la regulación por incremento, activación y/o revigorización de células T, (z) una o más sustancias capaces de antagonizar y/o inhibir moléculas solubles y citoquinas y sus receptores que se sabe que provocan la regulación por disminución, la desactivación y/o el agotamiento de las células T, y (v) una o más sustancias capaces de regular por disminución y/o agotar las células T reguladoras, favoreciendo de este modo la expansión ex vivo de las células T efectoras, y (w) una o más sustancias de los grupos (x), (y), (z) y/o (v). El grupo (w) puede ser una, dos o tres de las sustancias de (x), (y), (z) y/o (v). En una o más realizaciones, (w) es una o dos de las sustancias de (x). En una o varias realizaciones, (w) es una o dos de las sustancias de (y). En una o más realizaciones, (w) es una o dos de las sustancias de (z). En una o más realizaciones, (w) es una o dos de las sustancias de (v). (w) también puede ser cualquiera de las combinaciones de sustancias de la Tabla 1 enumeradas en las Tablas 2-41 y 43-44.

Estos pueden añadirse en el paso (b) y/o en el paso (c) de los presentes métodos, y pueden eliminarse durante las expansiones después de 2, 4, 6 o más días si sólo se necesitan para la expansión inicial. Pueden eliminarse por lavado del cultivo celular. Los estimuladores individuales de TME pueden añadirse juntos o en intervalos de tiempo, es decir, con un día de diferencia, o con 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días de diferencia.

En una o más realizaciones, el uno o más estimuladores del TME es/son uno o más inhibidores de puntos de control o inhibidores de sus ligandos como anti-PD1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-CTLA-4, anti-LAG3, anti-A2AR, anti-B7-H3, anti B7-H4, anti-BTLA, anti-IDO, anti-HVEM, anti-IDO, anti-TDO, anti-KIR, anti-NOX2, anti-TIM3, anti-galectina-9, anti-VISTA, anti-SIGLEC7/9, y en donde también se añaden opcionalmente a la segunda expansión el uno o más

inhibidores de puntos de control o inhibidores de sus ligandos.

En una o más realizaciones, las sustancias capaces de antagonizar y/o inhibir los receptores expresados en las células T (o sus ligandos) que se sabe que provocan la regulación por disminución, la desactivación y/o el agotamiento de las células T se seleccionan entre los grupos que consisten en: A: sustancias que actúan a través del receptor PD-1 en células T, B: sustancias que actúan a través del receptor CTLA-4 en células T, C: sustancias que actúan a través del receptor LAG-3 en células T, D: sustancias que actúan a través del receptor TIGIT/CD226 en células T, E: sustancias que actúan a través del receptor KIR en células T, F: sustancias que actúan a través del receptor TIM-3 en células T, G: sustancias que actúan a través del receptor BTLA en células T, y H: sustancias que actúan a través del receptor A2aR en células T. Debe entenderse que la definición de sustancias que actúan a través de un receptor determinado también puede abarcar el ligando del mismo receptor. Esto significa, por ejemplo, que en el caso del receptor PD-1 también pueden incluirse las sustancias dirigidas a PD-L1 o PD-L2. Por lo tanto, el Grupo A puede abarcar sustancias que actúan a través del receptor PD-1 en células T, así como su ligando o ligandos.

En una o más realizaciones, la sustancia del grupo A se selecciona entre una o más del grupo que consiste en pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab, sym021, atezolizumab, avelumab y durvalumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo A es pembrolizumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo A es nivolumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo A es cemiplimab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo A es sym021. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo A es atezolizumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo A es avelumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo A es durvalumab.

En una o más realizaciones, la sustancia del grupo B se selecciona entre una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo B es ipilimumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo B es tremelimumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo C se selecciona entre una o más del grupo que consiste en relatlimab, eftilagimo alfa y sym022. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo D es tiragolumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo E es lirilumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo F es sym023. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo G es 40E4 y PJ196.

En una o más realizaciones, las sustancias que son capaces de agonizar y/o estimular los receptores expresados en las células T que se sabe que provocan la regulación por incremento, la activación y/o la revigorización de las células T se seleccionan entre los grupos que consisten en: I: sustancias que actúan a través del receptor OX40/CD137 en células T, J: sustancias que actúan a través del receptor 4-1BB/CD137 en células T, K: sustancias que actúan a través del receptor CD28 en células T, L: sustancias que actúan a través del receptor ICOS en células T, M: sustancias que actúan a través del receptor GITR en células T, N: sustancias que actúan a través del receptor CD40L en células T, y O: sustancias que actúan a través del receptor CD27 en células T.

En una o más realizaciones, la sustancia del grupo J se selecciona entre una o más del grupo que consiste en urelumab y utomilumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo J es urelumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo J es utomilumab. Las sustancias del grupo J pueden usarse en combinación con una sustancia anti-CD3 como OKT-3. Por lo tanto, una combinación puede ser urelumab y OKT-3 (urelumab/OKT-3). Otra combinación puede ser utomilumab y OKT-3 (utomilumab/OKT-3). En una o más realizaciones, la sustancia del grupo K es teralizumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo O es valilumab.

En una o más realizaciones, una o más de las sustancias del grupo A pueden combinarse con una o más de las sustancias del grupo B. En una o más realizaciones, una o más de las sustancias del grupo A pueden combinarse con una o más de las sustancias del grupo B, y con una o más de las sustancias del grupo J. Estas combinaciones se muestran eficaces en los ejemplos de la presente divulgación. Esto significa que una o más sustancias del grupo A seleccionadas entre una o más del grupo que consiste en pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab, sym021, atezolizumab, avelumab pueden combinarse con una o más de las sustancias del grupo B que se selecciona entre una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab. A continuación, estas pueden combinarse con una o más sustancias del grupo J, seleccionadas entre una o más del grupo formado por urelumab y utomilumab. Las sustancias del grupo J pueden usarse en combinación con una sustancia anti-CD3 como OKT-3. Una combinación puede ser, por tanto, una o más sustancias del grupo A seleccionadas entre una o más del grupo que consiste en pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab, sym021, atezolizumab, avelumab combinadas con ipilimumab del grupo B y urelumab del grupo J. Una selección específica puede ser pembrolizumab combinado con ipilimumab del grupo B y urelumab del grupo J, con o sin una sustancia anti-CD3 como OKT-3.

En una o más realizaciones, las sustancias que son capaces de antagonizar y/o inhibir moléculas solubles y citoquinas y sus receptores que se sabe que provocan la regulación por disminución, desactivación y/o agotamiento de las células T se seleccionan entre los grupos que consisten en: P: sustancias que actúan a través del receptor IDO1/2 en células T, Q: sustancias que actúan a través del receptor TGF β en células T, R: sustancias que actúan a través del receptor IL-10 en células T, y S: sustancias que actúan a través del receptor IL-35 en células T.

En una o más realizaciones, la sustancia del grupo P es epacadostat. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo Q es linrodostat. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo R es galunisertib.

En una o más realizaciones, las sustancias que son capaces de regular por disminución y/o agotar las células T reguladoras favoreciendo de este modo la expansión ex vivo de células T efectoras se seleccionan entre los grupos que consisten en: T: ciclofosfamidias, U: TKI, V: sustancias que actúan a través de α CD25, y X: fusiones de IL2/toxina diftérica.

Los grupos A-X enumerados en la Tabla 1 pueden combinarse y usarse como sustancias múltiples, como se ve en las Tablas 2-44. Por tanto, en una o más realizaciones se usa IL2 en cualquiera de las combinaciones con cualquiera de las sustancias (ver la Tabla 1) en la primera expansión, es decir, el paso (b) de los métodos de la presente invención en cualquiera de las combinaciones enumeradas en las Tablas 2-44.

En una o más realizaciones, la sustancia del grupo U es sunitinib. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo V se selecciona entre una o más del grupo que consiste en sorafenib, imatinib y daclizumab. En una o más realizaciones, la sustancia del grupo X es dinileucina diftitox.

El ejemplo 4 demostró que la tasa de éxito de la expansión de TIL ex vivo aumentó cuando se añadieron estimuladores de TME al medio de cultivo cuando se iniciaron los cultivos de TIL como se describe en el ejemplo 2. El ejemplo 5 demostró que el rendimiento de TIL se incrementó y el tiempo de cultivo de TIL se redujo, cuando se añadieron estimuladores de TME al medio de cultivo como se realizó en el ejemplo 2, cuando se iniciaron los cultivos de TIL. El ejemplo 6 realizado como se describe en el ejemplo 2 demostró que el rendimiento de TIL aumentó, cuando se añadieron estimuladores de TME al medio de cultivo en diferentes concentraciones, cuando se iniciaron cultivos de TIL de varios tipos de tumor.

El ejemplo 9 ilustrado en la figura 27 demostró que la adición de estimuladores de TME al protocolo de fabricación de TIL jóvenes estándar como se realizó en el ejemplo 2 mejoró significativamente el crecimiento de TIL que dio como resultado un mayor número de células viables por fragmento tumoral ya sea antagonizando un receptor expresado en células T (en este caso PD-1) o su ligando (PD-L1) expresado en células tumorales y otras células en el microambiente tumoral. En las figuras 28-33, se ilustró el efecto de añadir estimuladores de TME a los cultivos iniciales de TIL del grupo PD-1 o del grupo PD-L1 al protocolo estándar de fabricación de TIL en cáncer de ovario, melanoma, pulmón, cabeza y cuello, colorrectal y de cuello uterino, respectivamente. Aunque no fue significativo en todas las condiciones, el efecto ilustró un patrón similar entre cánceres al ejemplo pan-tumoral PD-1/PD-L1 de la figura 27. El ejemplo demostró que dirigirse al receptor PD-1 o a su ligando PD-L1 era intercambiable y podía generar un efecto similar.

En las figuras 35-38, se ilustró el efecto de añadir inhibidores del grupo A de diferentes fabricantes a los cultivos iniciales de TIL en cáncer de ovario, melanoma, cabeza y cuello, y cuello uterino, respectivamente. El efecto ilustraba un patrón entre cánceres similar al del ejemplo pan-tumoral de la figura 34 y mostraba que podía usarse el estimulador de TME de diferentes fabricantes para obtener un efecto similar.

La figura 39 muestra que la expansión de TIL aumentó significativamente al añadir estimuladores de TME del grupo A (inhibidor de PD-1 o sus ligandos), del grupo B (inhibidor de CTLA-4 o su ligando), o al añadir ambos grupos A y B en comparación con el protocolo estándar de fabricación de TIL jóvenes. Hay una tendencia a que la coadición de estimuladores de TME del grupo A y B mejora aún más las tasas de crecimiento de TIL. La figura 40 muestra que un agonista de 4-1 BB y un anti-CD3, urelumab/OKT3 (grupo J) ya sea solos, o en combinación con un inhibidor de CTLA-4, ipilimumab (grupo B), o en combinación con un inhibidor de PD-1, pembrolizumab (grupo A), o en una combinación triple de ipilimumab y pembrolizumab mostraron todos un crecimiento de TIL muy fuerte en células viables por fragmento tumoral de varios cánceres. Por tanto, una realización de la presente invención se refiere al uso de uno o más estimuladores de TME del grupo A para los métodos de la presente invención. Una realización de la presente invención se refiere al uso de uno o más estimuladores de TME del grupo B para los métodos de la presente invención. Una realización de la presente invención se refiere al uso de uno o más estimuladores TME del grupo J para los métodos de la presente invención. Una realización adicional de la presente invención se refiere a una combinación en la que se usan una o más sustancias del grupo A y B junto con estimuladores de TME. Una realización adicional de la presente invención se refiere a una combinación en la que se usan una o más sustancias de los grupos A, B y J juntas como estimuladores del TME.

En la figura 41 se investigó el efecto de un retardo temporal para añadir urelumab/OKT3 al proceso de fabricación del cultivo de TIL jóvenes. Aquí, la combinación triple de urelumab/OKT3, ipilimumab y pembrolizumab añadida al cultivo inicial de TIL jóvenes en el día cero (lado izquierdo de la figura) se comparó con la adición de ipilimumab y pembrolizumab y la espera de 2 días para añadir urelumab/OKT3 en un retardo temporal (lado derecho de la figura). No hubo diferencias significativas entre las dos condiciones y ambas mostraron un crecimiento muy fuerte de TIL. En la figura 42, se investigó el efecto de añadir teralizumab solo (parte izquierda de la figura) o en combinación con ipilimumab y pembrolizumab al cultivo inicial de TIL jóvenes. Aunque no fue significativa, se observó una tendencia a que la combinación triple indujera una tasa de crecimiento más rápida de los TIL jóvenes en comparación con el

teralizumab solo.

El Ejemplo 12 ilustra que la tasa de éxito de la expansión ex vivo de TIL aumentó cuando se añadieron estimuladores de TME solos o en combinaciones al medio de cultivo cuando se iniciaron los cultivos de TIL. Por tanto, una realización de la presente invención se refiere al uso de estimuladores de TME en los métodos de acuerdo con la presente invención que dan como resultado un aumento de la expansión ex vivo con respecto al no uso de uno o más estimuladores de TME. Los métodos de la presente invención son ex vivo y no se realizan en o sobre el cuerpo. Representan la expansión de las células del paciente en un laboratorio que por lo tanto no requiere un médico en la producción.

El Ejemplo 13 ilustra que la adición de estimuladores de TME al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo de fabricación de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una mayor frecuencia de células T y un mayor número de células T viables. Una realización de la presente invención se refiere al uso de estimuladores de TME en los métodos de acuerdo con la presente invención que dan como resultado la generación de un producto de TIL que contiene una mayor frecuencia de células T y un mayor número de células T viables con respecto al no uso de uno o más estimuladores de TME.

El Ejemplo 14 ilustra que la adición de estimuladores de TME al paso de fabricación de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa con respecto al protocolo de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia comparable de células T de memoria efectoras. Una realización de la presente invención se refiere al uso de estimuladores de TME en los métodos de acuerdo con la presente invención que dan como resultado la generación de un producto de TIL que contiene una frecuencia comparable de células T de memoria efectoras con respecto al no uso de uno o más estimuladores de TME.

El Ejemplo 15 ilustra que la adición de estimuladores de TME solos y en combinaciones al paso de fabricación de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa con respecto al protocolo de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia aumentada de células T CD8+. Así, una realización de la presente invención se refiere al uso de estimuladores de TME en los métodos de acuerdo con la presente invención que dan como resultado la generación de un producto de TIL con una frecuencia aumentada de células T CD8+ con respecto al no uso de uno o más estimuladores de TME.

El Ejemplo 16 ilustra que la adición de estimuladores de TME al paso de fabricación de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa con respecto al protocolo de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia reducida de células T CD4+. Una realización de la presente invención se refiere al uso de estimuladores de TME en los métodos de acuerdo con la presente invención que dan como resultado la generación de un producto de TIL que contiene una frecuencia reducida de células T CD4+ con respecto al no uso de uno o más estimuladores de TME.

El Ejemplo 17 ilustra que la adición de estimuladores de TME al paso de fabricación de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia reducida de células NK. Por tanto, una realización de la presente invención se refiere al uso de estimuladores de TME en los métodos de acuerdo con la presente invención que dan como resultado la generación de un producto de TIL que contiene una frecuencia reducida de células NK con respecto al no uso de uno o más estimuladores de TME.

El Ejemplo 18 ilustra que la adición de estimuladores de TME al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo de fabricación de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia reducida de células NK pero una frecuencia aumentada de células T CD8+. Por tanto, una realización de la presente invención se refiere al uso de estimuladores de TME en los métodos de acuerdo con la presente invención que dan como resultado la generación de un producto de TIL que contiene una frecuencia reducida de células NK pero una frecuencia aumentada de células T CD8+ con respecto al no uso de uno o más estimuladores de TME.

El Ejemplo 19 ilustra que la adición de estimuladores de TME con un retardo temporal al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo de fabricación de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia aumentada de células T en total, células T CD8+ y una frecuencia reducida de células NK y células T CD4+. Una realización de la presente invención se refiere al uso de estimuladores de TME en los métodos de acuerdo con la presente invención que dan como resultado la generación de un producto de TIL que contiene una frecuencia aumentada de células T en total, células T CD8+ y una frecuencia reducida de células NK y células T CD4+ con respecto al no uso de uno o más estimuladores de TME.

El Ejemplo 20 ilustra que la adición de estimuladores de TME al paso de fabricación de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa con respecto al protocolo de TIL estándar existente que permitió la generación de

un producto de TIL que contenía una mayor frecuencia de células T LAG-3+ específicas de tumor. Como se sabe que LAG-3 es un marcador de agotamiento de células T y que las células T que tienen una mayor afinidad por los antígenos tumorales generalmente tienen una mayor tendencia a agotarse, la expansión de clones de células T CD8+ LAG-3+ puede llevar a una proporción más alta de células T reactivas al tumor, lo que posiblemente lleve a un mejor resultado clínico de este novedoso enfoque de la terapia con TIL. Por tanto, una realización de la presente invención se refiere al uso de estimuladores de TME en los métodos de acuerdo con la presente invención que dan como resultado una mayor frecuencia de células T LAG-3+ específicas de tumor con respecto al no uso de uno o más estimuladores de TME.

El Ejemplo 21 ilustra que la adición de estimuladores de TME al paso de fabricación de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa con respecto al protocolo de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una mayor frecuencia de células T CD8+ con un fenotipo más joven que expresaba CD28. Una realización de la presente invención se refiere al uso de estimuladores de TME en los métodos de acuerdo con la presente invención que dan como resultado una mayor frecuencia de células T CD8+ con un fenotipo más joven que expresan CD28 con respecto al no uso de uno o más estimuladores de TME.

El uso de los enfoques presentados en la presente permite alcanzar niveles de dosis muy superiores a los que se tolerarían in vivo. Por lo tanto, las concentraciones pueden ser por lo menos el doble de la dosis máxima tolerada in vivo. La concentración puede ser incluso superior, por ejemplo de 5 a 10 veces la dosis máxima tolerada in vivo. Así, en una o más realizaciones, la concentración de la sustancia es de 0,1 µg/ml a 300 µg/ml. La concentración también puede ser de 1 µg/ml a 100 µg/ml. La concentración también puede ser de 10 µg/ml a 100 µg/ml. La concentración también puede ser de 1 µg/ml a 10 µg/ml.

En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar un tipo de cáncer seleccionado de los grupos que consisten en: 1: tumores sólidos, 2: tumores no tratados con ICI, 3: tumores MSI-H, 4: tumores hematológicos, 5: tumores hipermutados (como tumores mutados POL-E y POL-D), y 6: tumores inducidos por virus.

En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar un tipo de cáncer seleccionado entre los grupos que consisten en cáncer de mama, cáncer de células renales, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer de cuello uterino, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, linfoma de Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de hígado y sarcomas.

En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar un cáncer de mama. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de células renales. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de vejiga. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el melanoma. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de cuello uterino. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer gástrico. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer colorrectal. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de pulmón. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de cabeza y cuello. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de ovario. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el linfoma de Hodgkin. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de páncreas. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar el cáncer de hígado. En una o más realizaciones, la población terapéutica de células T se usa para tratar sarcomas.

En una o más realizaciones, los pasos (a) a (c) o (d) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 días. En una o más realizaciones, los pasos (a) a (c) o (d) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 días. En una o más realizaciones, los pasos (a) a (c) o (d) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 25 días a aproximadamente 40 días. En una o más realizaciones, los pasos (a) a (c) o (d) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 30 días a aproximadamente 40 días. En una o más realizaciones, los pasos (a) a (b) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 10 días a aproximadamente 28 días. En una o más realizaciones, los pasos (a) a (b) se llevan a cabo en el plazo de un período de aproximadamente 10 días a aproximadamente 20 días.

En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL (paso (a)) puede proceder durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días o 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 1 día a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 2 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 3 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 4 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 5 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 6 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 7 días a 14 días. En algunas realizaciones, la

primera expansión de TIL puede proceder durante de 8 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 9 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 10 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 11 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 12 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 13 días a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 1 día a 11 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 2 días a 11 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 3 días a 11 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 4 días a 11 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 5 días a 11 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 6 días a 11 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 7 días a 11 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 8 días a 11 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 9 días a 11 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante de 10 días a 11 días. En algunas realizaciones, la primera expansión de TIL puede proceder durante 11 días.

En una o más realizaciones, el paso (b) se lleva a cabo en el plazo de un período de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 18 días. En una o más realizaciones, el paso (b) se lleva a cabo en el plazo de un período de entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 14 días. En una o más realizaciones, el paso (b) se lleva a cabo en el plazo de un período de entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 10 días. En una o más realizaciones, el paso (b) se lleva a cabo en el plazo de un período de entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 12 días.

En una o más realizaciones, el paso (c) se lleva a cabo en el plazo de un período de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 18 días. En una o más realizaciones, el paso (c) se lleva a cabo en el plazo de un período de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 28 días. En una o más realizaciones, el paso (c) se lleva a cabo en el plazo de un período de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 días. En una o más realizaciones, el paso (c) se lleva a cabo en el plazo de un período de entre aproximadamente 12 días y aproximadamente 18 días.

[illegible]

la fragmentación.

Uno de los principales descubrimientos ha sido que puede llegarse más rápidamente a más TIL. Esto tiene un gran valor porque se necesita una cierta cantidad de células para que el tratamiento médico sea relevante. Un mayor número de células más rápidamente reducirá los costes de producción y también proporcionará un tratamiento más rápido al paciente. En una o más realizaciones, el paso (b) da como resultado de 1×10^6 a 1×10^7 células, como de 2×10^6 a 5×10^6 células. En una o más realizaciones, el paso (b) da como resultado de 5×10^6 a 1×10^7 células. En una o más realizaciones, el paso (b) da como resultado de 1×10^6 a 5×10^7 células. En una o más realizaciones, el paso (b) da como resultado de 1×10^7 a 5×10^7 células. En una o más realizaciones, el paso (c) da como resultado de 1×10^7 a 1×10^{12} células, como de 1×10^8 a 5×10^9 células, como de 1×10^9 a 5×10^9 células, como de 1×10^8 a 5×10^{10} células, como de 1×10^9 a 5×10^{11} células. En una o más realizaciones, el paso (c) da como resultado un aumento de por lo menos 10^4 veces en comparación con el número de células después de la expansión en el paso (b), como un aumento de por lo menos 10^3 veces, como un aumento de por lo menos 10^2 veces, como un aumento de por lo menos 10 veces. En una o más realizaciones, el paso (c) da como resultado de 1×10^7 a 1×10^{10} células. En una o más realizaciones, el paso (c) da como resultado de 1×10^7 a 1×10^9 células. En una o más realizaciones, el paso (c) da como resultado de 1×10^7 a 1×10^8 células.

El Ejemplo 7 ilustrado en la figura 13 demostró que la adición de estimuladores del TME al protocolo estándar de fabricación de TIL jóvenes realizado como se describe en el ejemplo 2 aumentó significativamente el crecimiento de TIL, lo que dio como resultado un mayor número de células viables por fragmento tumoral. El Ejemplo 8 ilustrado en la figura 20 demostró que la adición de estimuladores de TME que o antagonizaban receptores expresados en células T (o sus ligandos), agonizaban receptores expresados en células T (o sus ligandos), revigorizaban células T agotadas (o sus ligandos), agotaban células T reguladoras y/o dirigían receptores expresados en células T procedentes de la familia CD28 (o sus ligandos procedentes de la familia de proteínas B7) al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo de TIL estándar existente que permitió un protocolo de fabricación de terapia de TIL más rápido. En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno (APC) son PBMC. En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno (APC) son células alimentadoras alogénicas. En algunas realizaciones, las células alimentadoras presentadoras de antígeno son células alimentadoras presentadoras de antígeno artificiales. En una realización, la proporción de TIL respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de aproximadamente 1 a 25, aproximadamente 1 a 50, aproximadamente 1 a 100, aproximadamente 1 a 125, aproximadamente 1 a 150, aproximadamente 1 a 175, aproximadamente 1 a 200, aproximadamente 1 a 225, aproximadamente 1 a 250, aproximadamente 1 a 275, aproximadamente 1 a 300, aproximadamente 1 a 325, aproximadamente 1 a 350, aproximadamente 1 a 375, aproximadamente 1 a 400, o aproximadamente 1 a 500. En una realización, la proporción de TIL con respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión está comprendida entre 1 y 50 y 1 y 300. En una realización, la proporción de TIL con respecto a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión está comprendida entre 1 y 100 y 1 y 200. En una o más realizaciones, las APC son APC artificiales (aAPC).

En una realización, las TIL expandidas usando APC de la presente divulgación se administran a un paciente como una composición farmacéutica. En una realización, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un tampón estéril. Los TIL expandidos usando PBMC de la presente divulgación pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, las células T se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferiblemente dura aproximadamente de 30 a 60 minutos. Otras vías de administración adecuadas incluyen intraperitoneal, intratecal e intralinfática. En una o más realizaciones se infunde en un paciente, la población terapéutica de TIL.

En una o más realizaciones, las células se extraen del cultivo celular y se crioconservan en un medio de almacenamiento antes de realizar el paso (c).

En una o más realizaciones, el método comprende además el paso de transducir la primera población de los TIL con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un anticuerpo de fragmento variable de cadena sencilla fusionado con por lo menos un endodominio de una molécula de señalización de células T.

En una o más realizaciones, el paso (c) comprende además un paso de extracción de las células del medio de cultivo celular.

En una o más realizaciones, el paso (a) comprende además el procesamiento del tumor extirpado en múltiples fragmentos tumorales, como de 4 a 50 fragmentos, como de 20 a 30 fragmentos. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $1 \text{ a } 50 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $5 \text{ a } 50 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $0,1 \text{ a } 10 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $0,1 \text{ a } 1 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $0,5 \text{ a } 5 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente $1 \text{ a } 10 \text{ mm}^3$. En una o más realizaciones,

los fragmentos tienen un tamaño de aproximadamente 1 a 3 mm³. Los términos "fragmentación", "fragmentar" y "fragmentado", como se usan en la presente para describir los procesos de alteración de un tumor, incluyen métodos de fragmentación mecánica como la trituración, el corte, la división y la morcelación del tejido tumoral, así como cualquier otro método para alterar la estructura física del tejido tumoral.

En una o más realizaciones, el mamífero es un humano. En algunas realizaciones, los TIL se obtienen a partir de fragmentos tumorales. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral se obtiene mediante disección cortante. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene entre aproximadamente 0,1 mm³ y 10 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene entre aproximadamente 1 mm³ y 10 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene entre aproximadamente 1 mm³ y 8 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene aproximadamente 1 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene aproximadamente 2 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene aproximadamente 3 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene aproximadamente 4 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene aproximadamente 5 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene aproximadamente 6 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene aproximadamente 7 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene aproximadamente 8 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene aproximadamente 9 mm³. En algunas realizaciones, el fragmento tumoral tiene aproximadamente 10 mm³. En algunas realizaciones, los tumores son de 1-4 mm x 1-4 mm x 1-4 mm. En algunas realizaciones, los tumores son de 1 mm x 1 mm x 1 mm. En algunas realizaciones, los tumores son de 2 mm x 2 mm x 2 mm. En algunas realizaciones, los tumores son de 3 mm x 3 mm x 3 mm. En algunas realizaciones, los tumores son de 4 mm x 4 mm x 4 mm. Actualmente se necesitan fragmentos de tamaño bastante grande (más de 5 mm³). La presente invención permite el uso de fragmentos más pequeños porque las células crecen de forma más optimizada alcanzando más rápidamente el número de células necesario para el tratamiento. El uso de fragmentos más pequeños significa que los pacientes que hasta ahora no han podido ser tratados debido, por ejemplo, a que su tumor ha sido demasiado pequeño o porque sólo ha sido posible obtener una muestra de tumor pequeña, ahora pueden tratarse. Por lo tanto, el tamaño de los fragmentos usados en los métodos de la presente invención puede ser importante.

En algunas realizaciones, la fragmentación del tumor se lleva a cabo para mantener la estructura interna del tumor. En algunas realizaciones, la fragmentación del tumor se lleva a cabo sin realizar un movimiento de aserrado con un escalpelo. En algunas realizaciones, los TIL se obtienen a partir de digestiones tumorales. En algunas realizaciones, los digeridos tumorales se generaron por incubación en medios enzimáticos, por ejemplo pero no limitados a RPMI 1640, 2 mM GlutaMAX, 10 mg/ml de gentamicina, 30 U/ml de DNasa, y 1,0 mg/ml de colagenasa, seguido de disociación mecánica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Después de colocar el tumor en el medio enzimático, el tumor puede disociarse mecánicamente durante aproximadamente 1 minuto. A continuación, la solución puede incubarse durante 30 minutos a 37°C en un 5% de CO₂ y se vuelve a disociar mecánicamente durante aproximadamente 1 minuto. Después de incubarse de nuevo durante 30 minutos a 37°C en 5% de CO₂, el tumor puede disociarse mecánicamente una tercera vez durante aproximadamente 1 minuto. En algunas realizaciones, después de la tercera disrupción mecánica, si había trozos grandes de tejido, se aplicaron 1 o 2 disociaciones mecánicas adicionales a la muestra, con o sin 30 minutos adicionales de incubación a 37°C en 5% de CO₂. En algunas realizaciones, al final de la incubación final si la suspensión celular contiene un gran número de glóbulos rojos o células muertas, puede realizarse una separación en gradiente de densidad usando Ficoll para eliminar estas células.

En una o más realizaciones, el medio de cultivo celular se proporciona en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un recipiente G-Rex y una bolsa celular Xuri.

Un aspecto se refiere a una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que puede obtenerse mediante un método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

Un aspecto adicional se refiere a linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer, el tratamiento comprendiendo los pasos de: cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL a partir de un tumor extirpado de un mamífero; realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL, en donde el uno o más estimuladores de TME comprenden por lo menos una sustancia del grupo B seleccionada de una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab; realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2 adicional, anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica; y después de administrar quimioterapia linfodeplectora no mieloablativa, administrar al mamífero la población terapéutica de células T, en donde las células T administradas al mamífero, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero.

En una realización, la quimioterapia no mieloablativa es ciclofosfamida 60 mg/kg/d durante 2 días (días 7 y 2 antes de la infusión de TIL) y fludarabina 25 mg/m²/d durante 5 días (días 5 a 1 antes de la infusión de TIL). En una realización, después de la quimioterapia no mieloablativa y la infusión de TIL (en el día 0) de acuerdo con la presente divulgación, el paciente recibe una infusión intravenosa de IL-2 por vía intravenosa a 720.000 IU/kg cada 8 horas hasta tolerancia fisiológica.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la población de los TIL puede obtenerse por un método que comprende los pasos de (b) realizar una expansión inicial de una primera población de TIL obtenida de un tumor extirpado de un paciente en un primer medio de cultivo celular para obtener una segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es por lo menos 5 veces mayor en número que la primera población de TIL, y en donde el primer medio de cultivo celular comprende IL-2; (c) realizar una expansión rápida de la segunda población de TIL usando una población de células presentadoras de antígeno artificiales mieloides (aAPC mieloides) en un segundo medio de cultivo celular para obtener una tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es por lo menos 50 veces mayor en número que la segunda población de TIL después de 7 días desde el inicio de la expansión rápida; y en donde el segundo medio de cultivo celular comprende IL-2 y anti-CD3; (d) administrar una porción terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL a un paciente con cáncer. En algunas realizaciones, el método comprende un primer paso (a) de obtención de la primera población de TIL a partir de un tumor extirpado de un paciente. En algunas realizaciones, la IL-2 está presente en una concentración inicial de aproximadamente 3000 IU/ml y el anticuerpo anti-CD3 está presente en una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/ml en el segundo medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la primera expansión se lleva a cabo durante un periodo no superior a 14 días. En algunas realizaciones, la primera expansión se lleva a cabo usando un recipiente permeable al gas. En algunas realizaciones, la segunda expansión se lleva a cabo usando un recipiente permeable al gas. En algunas realizaciones, la proporción de la segunda población de los TIL con respecto a la población de las aAPC en la expansión rápida es de entre 1 a 80 y 1 a 400. En algunas realizaciones, la proporción de la segunda población de TIL con respecto a la población de aAPC en la expansión rápida es de aproximadamente 1 a 300.

A continuación se proporcionan las siguientes figuras y ejemplos para ilustrar la presente invención. Se pretende que sean ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos de ninguna manera.

Tablas

Tabla 1

Grupo	Receptor en células T	Ligando	
A	PD-1	PD-L1/PD-L2	antagonista
B	CTLA-4	CD80/CD86	antagonista
C	GAL-3	Sitio(s) de unión MHC I/II LAG-3	antagonista
D	TIGIT/CD226	CD155/CD112	antagonista
E	KIR	Sitio(s) de unión MHC I KIR	antagonista
F	TIM-3	Galectina 9	antagonista
G	BTLA	HVEM	antagonista
H	A2aR	Adenosina	antagonista
Grupo	Receptor en células T	Ligando	
I	OX40/CD134	OX40L	agonista
J	4-1BB/CD137	4-1BBL	agonista
K	CD28	CD80/CD86	agonista
L	ICOS	ICOSL/B7RP1	agonista
M	GITR	GITRL	agonista
N	CD40L	CD40	agonista
O	CD27	CD70	agonista
Grupo	Factor soluble/citoquina	Receptor	
P	IDO1/2		antagonista
Q	TGFβ	Receptor TGFβ tipo I/II/III	antagonista
R	IL-10	IL10Rα	antagonista
S	IL-35	IL-35R	antagonista
Grupo	Factor soluble/citoquina		
T	ciclofosfamida		
U	TKIs		
V	αCD25		
X	Fusión IL2/toxina diftérica		

Tabla 2

Sustancia única:	
IL2	A
IL2	B

(continuación)

Sustancia única:	
IL2	C
IL2	D
IL2	E
IL2	F
IL2	G
IL2	H
IL2	I
IL2	J
IL2	K
IL2	L
IL2	M
IL2	N
IL2	O
IL2	P
IL2	Q
IL2	R
IL2	S
IL2	T
IL2	U
IL2	V
IL2	X

Tabla 3

Sustancia dual del grupo PD1:		
IL2	A	B
IL2	A	C
IL2	A	D
IL2	A	E
IL2	A	F
IL2	A	G
IL2	A	H
IL2	A	I
IL2	A	J
IL2	A	K
IL2	A	L
IL2	A	M
IL2	A	N
IL2	A	O
IL2	A	P
IL2	A	Q
IL2	A	R
IL2	A	S
IL2	A	T
IL2	A	U
IL2	A	V
IL2	A	X

Tabla 4

Sustancia triple del grupo PD1/CTLA-4:			
IL2	A	B	C
IL2	A	B	D

(continuación)

Sustancia triple del grupo PD1/CTLA-4:			
IL2	A	B	E
IL2	A	B	F
IL2	A	B	G
IL2	A	B	H
IL2	A	B	I
IL2	A	B	J
IL2	A	B	K
IL2	A	B	L
IL2	A	B	M
IL2	A	B	N
IL2	A	B	O
IL2	A	B	P
IL2	A	B	Q
IL2	A	B	R
IL2	A	B	S
IL2	A	B	T
IL2	A	B	U
IL2	A	B	V
IL2	A	B	X

Tabla 5

Sustancia triple del grupo PD1/LAG-3:			
IL2	A	C	D
IL2	A	C	E
IL2	A	C	F
IL2	A	C	G
IL2	A	C	H
IL2	A	C	I
IL2	A	C	J
IL2	A	C	K
IL2	A	C	L
IL2	A	C	M
IL2	A	C	N
IL2	A	C	O
IL2	A	C	P
IL2	A	C	Q
IL2	A	C	R
IL2	A	C	S
IL2	A	C	T
IL2	A	C	U
IL2	A	C	V
IL2	A	C	X

Tabla 6

Sustancia triple del grupo PD1/TIGIT:			
IL2	A	D	E
IL2	A	D	F
IL2	A	D	G
IL2	A	D	H
IL2	A	D	I
IL2	A	D	J

(continuación)

<i>Sustancia triple del grupo PD1/TIGIT:</i>			
IL2	A	D	K
IL2	A	D	L
IL2	A	D	M
IL2	A	D	N
IL2	A	D	O
IL2	A	D	P
IL2	A	D	Q
IL2	A	D	R
IL2	A	D	S
IL2	A	D	T
IL2	A	D	U
IL2	A	D	V
IL2	A	D	X

Tabla 7

<i>Sustancia triple del grupo PD1/KIR:</i>			
IL2	A	E	F
IL2	A	E	G
IL2	A	E	H
IL2	A	E	I
IL2	A	E	J
IL2	A	E	K
IL2	A	E	L
IL2	A	E	M
IL2	A	E	N
IL2	A	E	O
IL2	A	E	P
IL2	A	E	Q
IL2	A	E	R
IL2	A	E	S
IL2	A	E	T
IL2	A	E	U
IL2	A	E	V
IL2	A	E	X

Tabla 8

<i>Sustancia triple del grupo PD1/TIM-3:</i>			
IL2	A	F	G
IL2	A	F	H
IL2	A	F	I
IL2	A	F	J
IL2	A	F	K
IL2	A	F	L
IL2	A	F	M
IL2	A	F	N
IL2	A	F	O
IL2	A	F	P
IL2	A	F	Q
IL2	A	F	R
IL2	A	F	S
IL2	A	F	T

(continuación)

Sustancia triple del grupo PD1/TIM-3:			
IL2	A	F	U
IL2	A	F	V
IL2	A	F	X

Tabla 9

Sustancia triple del grupo PD1/BTLA:			
IL2	A	G	H
IL2	A	G	I
IL2	A	G	J
IL2	A	G	K
IL2	A	G	L
IL2	A	G	M
IL2	A	G	N
IL2	A	G	O
IL2	A	G	P
IL2	A	G	Q
IL2	A	G	R
IL2	A	G	S
IL2	A	G	T
IL2	A	G	U
IL2	A	G	V
IL2	A	G	X

Tabla 10

Sustancia triple del grupo PD1/A2aR:			
IL2	A	H	I
IL2	A	H	J
IL2	A	H	K
IL2	A	H	L
IL2	A	H	M
IL2	A	H	N
IL2	A	H	O
IL2	A	H	P
IL2	A	H	Q
IL2	A	H	R
IL2	A	H	S
IL2	A	H	T
IL2	A	H	U
IL2	A	H	V
IL2	A	H	X

Tabla 11

Sustancia triple del grupo PD1/OX40:			
IL2	A	I	J
IL2	A	I	K
IL2	A	I	L
IL2	A	I	M
IL2	A	I	N
IL2	A	I	O
IL2	A	I	P
IL2	A	I	Q
IL2	A	I	R

(continuación)

Sustancia triple del grupo PD1/OX40:			
IL2	A	I	S
IL2	A	I	T
IL2	A	I	U
IL2	A	I	V
IL2	A	I	X

Tabla 12

Sustancia triple del grupo PD1/4-1BB:			
IL2	A	J	K
IL2	A	J	L
IL2	A	J	M
IL2	A	J	N
IL2	A	J	O
IL2	A	J	P
IL2	A	J	Q
IL2	A	J	R
IL2	A	J	S
IL2	A	J	T
IL2	A	J	U
IL2	A	J	V
IL2	A	J	X

Tabla 13

Sustancia triple del grupo PD1/CD28:			
IL2	A	K	L
IL2	A	K	M
IL2	A	K	N
IL2	A	K	O
IL2	A	K	P
IL2	A	K	Q
IL2	A	K	R
IL2	A	K	S
IL2	A	K	T
IL2	A	K	U
IL2	A	K	V
IL2	A	K	X

Tabla 14

Sustancia triple del grupo PD1/ICOS:			
IL2	A	L	M
IL2	A	L	N
IL2	A	L	O
IL2	A	L	P
IL2	A	L	Q
IL2	A	L	R
IL2	A	L	S
IL2	A	L	T
IL2	A	L	U
IL2	A	L	V
IL2	A	L	X

Tabla 15

<i>Sustancia triple del grupo PD1/GITR:</i>			
IL2	A	M	N
IL2	A	M	O
IL2	A	M	P
IL2	A	M	Q
IL2	A	M	R
IL2	A	M	S
IL2	A	M	T
IL2	A	M	U
IL2	A	M	V
IL2	A	M	X

Tabla 16

<i>Sustancia triple del grupo PD1/CD40:</i>			
IL2	A	N	O
IL2	A	N	P
IL2	A	N	Q
IL2	A	N	R
IL2	A	N	S
IL2	A	N	T
IL2	A	N	U
IL2	A	N	V
IL2	A	N	X

Tabla 17

<i>Sustancia triple del grupo PD1/CD27:</i>			
IL2	A	O	P
IL2	A	O	Q
IL2	A	O	R
IL2	A	O	S
IL2	A	O	T
IL2	A	O	U
IL2	A	O	V
IL2	A	O	X

Tabla 18

<i>Sustancia triple del grupo PD1/IDO:</i>			
IL2	A	P	Q
IL2	A	P	R
IL2	A	P	S
IL2	A	P	T
IL2	A	P	U
IL2	A	P	V
IL2	A	P	X

Tabla 19

<i>Sustancia triple del grupo PD1/TGFβ:</i>			
IL2	A	Q	R
IL2	A	P	S
IL2	A	P	T
IL2	A	P	U
IL2	A	P	V
IL2	A	P	X

Tabla 20

Agente triple del grupo PD1/IL10:			
IL2	A	R	S
IL2	A	R	T
IL2	A	R	U
IL2	A	R	V
IL2	A	R	X

Tabla 21

Agente triple del grupo PD1/Adenosina:			
IL2	A	S	T
IL2	A	S	U
IL2	A	S	V
IL2	A	S	X

Tabla 22

Sustancia dual del grupo CTLA-4:		
IL2	B	C
IL2	B	D
IL2	B	E
IL2	B	F
IL2	B	G
IL2	B	H
IL2	B	I
IL2	B	J
IL2	B	K
IL2	B	L
IL2	B	M
IL2	B	N
IL2	B	O
IL2	B	P
IL2	B	Q
IL2	B	R
IL2	B	S
IL2	B	T
IL2	B	U
IL2	B	V
IL2	B	X

Tabla 23

Sustancia triple del grupo CTLA-4/LAG-3:			
IL2	B	C	D
IL2	B	C	E
IL2	B	C	F
IL2	B	C	G
IL2	B	C	H
IL2	B	C	I
IL2	B	C	J
IL2	B	C	K
IL2	B	C	L
IL2	B	C	M
IL2	B	C	N
IL2	B	C	O
IL2	B	C	P

(continuación)

Sustancia triple del grupo CTLA-4/LAG-3:			
IL2	B	C	Q
IL2	B	C	R
IL2	B	C	S
IL2	B	C	T
IL2	B	C	U
IL2	B	C	V
IL2	B	C	X

Tabla 24

Sustancia triple del grupo CTLA-4/TIGIT:			
IL2	B	D	E
IL2	B	D	F
IL2	B	D	G
IL2	B	D	H
IL2	B	D	I
IL2	B	D	J
IL2	B	D	K
IL2	B	D	L
IL2	B	D	M
IL2	B	D	N
IL2	B	D	O
IL2	B	D	P
IL2	B	D	Q
IL2	B	D	R
IL2	B	D	S
IL2	B	D	T
IL2	B	D	U
IL2	B	D	V
IL2	B	D	X

Tabla 25

Sustancia triple del grupo CTLA-4/KIR:			
IL2	B	E	F
IL2	B	E	G
IL2	B	E	H
IL2	B	E	I
IL2	B	E	J
IL2	B	E	K
IL2	B	E	L
IL2	B	E	M
IL2	B	E	N
IL2	B	E	O
IL2	B	E	P
IL2	B	E	Q
IL2	B	E	R
IL2	B	E	S
IL2	B	E	T
IL2	B	E	U
IL2	B	E	V
IL2	B	E	X

Tabla 26

Sustancia triple del grupo CTLA-4/TIM-3:			
IL2	B	F	G
IL2	B	F	H
IL2	B	F	I
IL2	B	F	J
IL2	B	F	K
IL2	B	F	L
IL2	B	F	M
IL2	B	F	N
IL2	B	F	O
IL2	B	F	P
IL2	B	F	Q
IL2	B	F	R
IL2	B	F	S
IL2	B	F	T
IL2	B	F	U
IL2	B	F	V
IL2	B	F	X
IL2	B	F	Y

Tabla 27

Sustancia triple del grupo CTLA-4/BTLA:			
IL2	B	G	H
IL2	B	G	I
IL2	B	G	J
IL2	B	G	K
IL2	B	G	L
IL2	B	G	M
IL2	B	G	N
IL2	B	G	O
IL2	B	G	P
IL2	B	G	Q
IL2	B	G	R
IL2	B	G	S
IL2	B	G	T
IL2	B	G	U
IL2	B	G	V
IL2	B	G	X
IL2	B	G	Y

Tabla 28

Sustancia triple del grupo CTLA-4/A2aR:			
IL2	B	H	I
IL2	B	H	J
IL2	B	H	K
IL2	B	H	L
IL2	B	H	M
IL2	B	H	N
IL2	B	H	O
IL2	B	H	P
IL2	B	H	Q
IL2	B	H	R

(continuación)

Sustancia triple del grupo CTLA-4/A2aR:			
IL2	B	H	S
IL2	B	H	T
IL2	B	H	U
IL2	B	H	V
IL2	B	H	X
IL2	B	H	Y

Tabla 29

Sustancia triple del grupo CTLA-4/OX40:			
IL2	B	I	J
IL2	B	I	K
IL2	B	I	L
IL2	B	I	M
IL2	B	I	N
IL2	B	I	O
IL2	B	I	P
IL2	B	I	Q
IL2	B	I	R
IL2	B	I	S
IL2	B	I	T
IL2	B	I	U
IL2	B	I	V
IL2	B	I	X
IL2	B	I	Y

Tabla 30

Sustancia triple del grupo CTLA-4/4-1BB:			
IL2	B	J	K
IL2	B	J	L
IL2	B	J	M
IL2	B	J	N
IL2	B	J	O
IL2	B	J	P
IL2	B	J	Q
IL2	B	J	R
IL2	B	J	S
IL2	B	J	T
IL2	B	J	U
IL2	B	J	V
IL2	B	J	X
IL2	B	J	Y

Tabla 31

Sustancia triple del grupo CTLA-4/CD28:			
IL2	B	K	L
IL2	B	K	M
IL2	B	K	N
IL2	B	K	O
IL2	B	K	P
IL2	B	K	Q
IL2	B	K	R
IL2	B	K	S

(continuación)

Sustancia triple del grupo CTLA-4/CD28:			
IL2	B	K	T
IL2	B	K	U
IL2	B	K	V
IL2	B	K	X
IL2	B	K	Y

Tabla 32

Sustancia triple del grupo CTLA-4/ICOS:			
IL2	B	L	M
IL2	B	L	N
IL2	B	L	O
IL2	B	L	P
IL2	B	L	Q
IL2	B	L	R
IL2	B	L	S
IL2	B	L	T
IL2	B	L	U
IL2	B	L	V
IL2	B	L	X
IL2	B	L	Y

Tabla 33

Sustancia triple del grupo CTLA-4/GITR:			
IL2	B	M	N
IL2	B	M	O
IL2	B	M	P
IL2	B	M	Q
IL2	B	M	R
IL2	B	M	S
IL2	B	M	T
IL2	B	M	U
IL2	B	M	V
IL2	B	M	X
IL2	B	M	Y

Tabla 34

Sustancia triple del grupo CTLA-4/CD40:			
IL2	B	N	O
IL2	B	N	P
IL2	B	N	Q
IL2	B	N	R
IL2	B	N	S
IL2	B	N	T
IL2	B	N	U
IL2	B	N	V
IL2	B	N	X
IL2	B	N	Y

Tabla 35

Sustancia triple del grupo CTLA-4/CD27:			
IL2	B	O	P
IL2	B	O	Q

(continuación)

Sustancia triple del grupo CTLA-4/CD27:			
IL2	B	O	R
IL2	B	O	S
IL2	B	O	T
IL2	B	O	U
IL2	B	O	V
IL2	B	O	X
IL2	B	O	Y

Tabla 37

Sustancia triple del grupo CTLA-4/IDO:			
IL2	B	P	Q
IL2	B	P	R
IL2	B	P	S
IL2	B	P	T
IL2	B	P	U
IL2	B	P	V
IL2	B	P	X
IL2	B	P	Y

Tabla 38

Sustancia triple del grupo CTLA-4/TGFβ:			
IL2	B	Q	R
IL2	B	P	S
IL2	B	P	T
IL2	B	P	U
IL2	B	P	V
IL2	B	P	X
IL2	B	P	Y

Tabla 39

Sustancia triple del grupo CTLA-4/IL10:			
IL2	B	R	S
IL2	B	R	T
IL2	B	R	U
IL2	B	R	V
IL2	B	R	X
IL2	B	R	Y

Tabla 40

Agente triple del grupo CTLA-4/Adenosina:			
IL2	B	S	T
IL2	B	S	U
IL2	B	S	V
IL2	B	S	X
IL2	B	S	Y

Tabla 41

Agente triple del grupo CTLA-4/IL35:			
IL2	B	T	U
IL2	B	T	V
IL2	B	T	X
IL2	B	T	Y

Tabla 42

Nombre	Diagnóstico	Género	Edad	Etnia	Etapas	Tratamiento previo
MM1	Melanoma	Mujer	76	Caucásico	II	sin tratamiento previo
MM2	Melanoma	Mujer	48	Caucásico	IIIB	sin tratamiento previo
MM3	Melanoma	Hombre	56	Caucásico	IIB	sin tratamiento previo
HN1	Cáncer de cabeza y cuello	Hombre	64	Caucásico	III	sin tratamiento previo
HN2	Cáncer de cabeza y cuello	Hombre	69	Caucásico	III	sin tratamiento previo
HN3	Cáncer de cabeza y cuello	Hombre	67	Caucásico	IV	sin tratamiento previo
CC1	Carcinoma colorrectal	Mujer	88	Caucásico	IIA	sin tratamiento previo
CC2	Carcinoma colorrectal	Hombre	81	Caucásico	I	sin tratamiento previo
OC1	Carcinoma de ovario	Mujer	56	Caucásico	IIIC	sin tratamiento previo
OC2	Carcinoma de ovario	Mujer	52	Caucásico	IV	sin tratamiento previo
OC3	Carcinoma de ovario	Mujer	54	Caucásico	IIIA	sin tratamiento previo
LC1	NSCLC	Hombre	72	Caucásico	IB	sin tratamiento previo
LC2	NSCLC	Hombre	62	Caucásico	IB	sin tratamiento previo
CE1	Cáncer de cuello uterino	Mujer	64	Caucásico	IB	sin tratamiento previo

Tabla 43

	Grupo	Estimulante	Objetivo	Fabricante
TME-S	Grupo A	pembrolizumab	PD-1	Merck
		nivolumab		Bristol-Meyers Squibb
		avelumab	PD-L1	Pfizer
		durvalumab		AstraZeneca
	Grupo B	ipilimumab	CTLA-4	Bristol-Meyers Squibb
	Grupo C	relatlimab	GAL-3	Creative Biolabs
	Grupo D	tiragolumab	TIGIT	Creative Biolabs
	Grupo J	urelumab/OKT3	4-1BB (CD137) y CD3	Creative Biolabs/Miltenyi
	Grupo K	theralizumab	CD28	Creative Biolabs

Tabla 44

Grupo	Estimulante	Fabricante
Antagonista	pembrolizumab	Merck
	nivolumab	Bristol-Meyers Squibb
	avelumab	Pfizer
	durvalumab	AstraZeneca
	ipilimumab	Bristol-Meyers Squibb
	relatlimab	Creative Biolabs
	tiragolumab	Creative Biolabs
Agonista	urelumab/OKT3	Creative Biolabs/Miltenyi
	theralizumab	Creative Biolabs
Familia CD28	pembrolizumab	Merck
	nivolumab	Bristol-Meyers Squibb
	avelumab	Pfizer
	durvalumab	AstraZeneca
	ipilimumab	Bristol-Meyers Squibb
	theralizumab	Creative Biolabs
Revigorizante	pembrolizumab	Merck
	nivolumab	Bristol-Meyers Squibb
	avelumab	Pfizer
	durvalumab	AstraZeneca
	relatlimab	Creative Biolabs
Depleción	ipilimumab	Bristol-Meyers Squibb
	tiragolumab	Creative Biolabs

Tabla 45

Marcador	Clon	Empresa
CD3	UCHT1	BD Biosciences
CD4	SK3	BD Biosciences
CD8	RPA-T8	BD Biosciences
CD27	L128	BD Biosciences
CD28	CD28.2	BD Biosciences
CD45RA	H1100	BD Biosciences
CD56	B159	BD Biosciences
CD57	NK-1	BD Biosciences
CD69	FN50	BD Biosciences
BTLA	J168-540	BD Biosciences
CCR7	2-L1-A	BD Biosciences
GAL-3	T47-530	BD Biosciences
PD-1	MIH4	BD Biosciences
TIM-3	7D3	BD Biosciences
FVS780		BD Biosciences

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un tumor que contiene linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) extirpado de un mamífero, cortado en fragmentos más pequeños y colocado en una o más placas de cultivo celular de múltiples pocillos. Aquí los fragmentos se incuban en medio de cultivo celular que contiene interleucina 2 (IL-2) y estimuladores del microambiente tumoral (TME) durante una primera expansión para producir una segunda población de TIL. A continuación, la segunda población de TIL se expande adicionalmente en una segunda expansión (a menudo denominada rápida) en medio de cultivo celular que contiene células alimentadoras, anticuerpo anti-CD3 e IL-2. La segunda expansión puede realizarse en uno o más pasos, dependiendo del protocolo y del equipo de cultivo celular, usando uno o más recipientes en subpasos adicionales, pero por razones de simplicidad en la figura sólo se ilustra como un paso. Por último, los TIL se recogen para producir la tercera población terapéutica de TIL y se vuelven a suspender en el producto final de TIL, que se infunde de nuevo al mamífero para promover la regresión del cáncer.

La Figura 2 muestra el porcentaje de expansiones celulares con éxito (> 50.000 células/fragmento) usando IL-2, durvalumab (Durva), avelumab (Avelu), relatlimab (Relatli), tiragolumab (Tira), Pembrolizumab (Pembro), ipilimumab (Ipi), theralizumab (Thera), nivolumab (Nivo) o urelumab/OKT3 (Ure).

La Figura 3 muestra el porcentaje de expansiones celulares con éxito (en negro) y sin éxito (en blanco) (> 50.000 células/fragmento) usando IL-2, durvalumab (Durva), avelumab (Avelu), relatlimab (Relatli), tiragolumab (Tira), pembrolizumab (Pembro), ipilimumab (Ipi), theralizumab (Thera), nivolumab (Nivo) o urelumab/OKT3 (Ure).

La Figura 4 muestra el porcentaje de expansiones celulares con éxito (> 50.000 células/fragmento) usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo.

La Figura 5 muestra el porcentaje de expansiones celulares con éxito (negro) y sin éxito (blanco) (> 50.000 células/fragmento) usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo.

La Figura 6 muestra el número total de células y el tiempo de expansión de los cultivos celulares en un matraz G-Rex que contiene IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Las líneas de indicación visual del crecimiento se añadieron manualmente por simplicidad.

La Figura 7 muestra el número total de células para la expansión celular de cáncer de cabeza y cuello (HN), melanoma metastásico (MM) y cáncer de ovario (OC) usando anti-CTLA-4 (ipilimumab) a concentración baja (1 µg/ml), media (5 µg/ml) y alta (25 µg/ml).

La Figura 8 muestra el número total de células para la expansión celular de cáncer de cabeza y cuello (HN), melanoma metastásico (MM) y cáncer de ovario (OC) usando anti-PD1 (pembrolizumab) a concentración baja (1 µg/ml), media (5 µg/ml) y alta (25 µg/ml).

La Figura 9 muestra el número total de células para la expansión celular de cáncer de cabeza y cuello (HN), melanoma metastásico (MM) y cáncer de ovario (OC) usando anti-4-1BB (urelumab) a concentración baja (2 µg/ml) y media (10 µg/ml) junto con OKT3 (30 ng/ml).

La Figura 10 muestra el número total de células para la expansión celular de cáncer de cabeza y cuello (HN), melanoma metastásico (MM) y cáncer de ovario (OC) usando anti-CD28 (theralizumab) a concentración baja (0,02 µg/ml), media (0,1 µg/ml), alta (2 µg/ml) y muy alta (2 µg/ml).

La Figura 11 muestra el número total de células para la expansión celular de cáncer de cabeza y cuello (HN), melanoma metastásico (MM) y cáncer de ovario (OC) usando anti-PD-L1 (avelumab) a concentración baja (2 µg/ml), media (10 µg/ml) y alta (50 µg/ml).

La Figura 12 muestra el número total de células para la expansión celular de cáncer de cabeza y cuello (HN), melanoma metastásico (MM) y cáncer de ovario (OC) usando anti-PD-1 (nivolumab) a concentración baja (2 µg/ml), media (10 µg/ml) y alta (50 µg/ml).

La Figura 13 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cualquier tipo de cáncer en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 14 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de cuello uterino en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 15 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de melanoma en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 16 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de ovario en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 17 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de cabeza y cuello en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 18 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de pulmón en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 19 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer colorrectal en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 20 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cualquier tipo de cáncer en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- tratamiento antagonista, agonista, familia CD28, revigorizante o de depleción. Consultar la tabla 44 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 21 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de melanoma en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- tratamiento antagonista, agonista, de la familia CD28, revigorizante o de depleción. Consultar la tabla 44 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los

controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 22 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de ovario en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- tratamiento antagonista, agonista, familia CD28, revigorizante o de depleción. Consultar la tabla 44 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 23 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de pulmón en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- tratamiento antagonista, agonista, familia CD28, revigorizante o de depleción. Consultar la tabla 44 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 24 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de cuello uterino en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- tratamiento antagonista, agonista, familia CD28, revigorizante o de depleción. Consultar la tabla 44 para los estimuladores específicos de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 25 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer colorrectal en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- tratamiento antagonista, agonista, familia CD28, revigorizante o de depleción. Consultar la tabla 44 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 26 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de cabeza y cuello en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- tratamiento antagonista, agonista, de la familia CD28, revigorizante o de depleción. Consultar la tabla 44 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 27 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cualquier tipo de cáncer en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- PD-1, PD-L1. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 28 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de ovario en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- PD-1, PD-L1. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 29 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de melanoma en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- PD-1, PD-L1. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 30 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de pulmón en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- PD-1, PD-L1. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 31 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de cabeza y cuello en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- PD-1, PD-L1. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

La Figura 32 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer colorrectal en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- PD-1, PD-L1. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas

comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

5 La Figura 33 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de cuello uterino en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- PD-1, PD-L1. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

10 La Figura 34 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cualquier tipo de cáncer en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- grupo A, pembrolizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

15 La Figura 35 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de ovario en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- grupo A, pembrolizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

20 La Figura 36 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de melanoma en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- grupo A, pembrolizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

25 La Figura 37 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de cabeza y cuello en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- grupo A, pembrolizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

30 La Figura 38 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cáncer de cuello uterino en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- grupo A, pembrolizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

35 La Figura 39 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cualquier tipo de cáncer en un matraz G-Rex que contiene IL-2 +/- Grupo A, Grupo B o Grupo A+B. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (IL-2). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

40 La Figura 40 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cualquier tipo de cáncer en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- urelumab/OKT3, ipilimumab (ipi), pembrolizumab (pembro). Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas comparando cada grupo con los controles (urelumab/OKT3). $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

45 La Figura 41 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cualquier tipo de cáncer en un matraz G-Rex que contenía IL-2 +/- urelumab/OKT3, ipilimumab (ipi), pembrolizumab (pembro) con y sin retardo temporal. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

50 La Figura 42 muestra el número de células viables por fragmento después de la incubación de tejido tumoral de cualquier tipo de cáncer en un matraz G-Rex que contenía IL-2 + theralizumab o IL-2 + theralizumab, ipilimumab (ipi) y pembrolizumab (pembro). Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p > 0,05$ se consideró no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

55 La Figura 43 muestra el porcentaje de expansiones celulares con éxito (> 50.000 células/fragmento) para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo.

65

La Figura 44 muestra la frecuencia de células T (CD3+) para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer los estimuladores usados. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo.

La Figura 45 muestra la frecuencia de células T (CD3+) para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo, $*p<0,05$, $**p<0,01$.

La Figura 46 muestra el número de células T viables (CD3+) por fragmento tumoral para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar los estimuladores usados en la tabla 43. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$.

La Figura 47 muestra el número de células T viables (CD3+) por fragmento tumoral para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$.

La Figura 48 muestra la frecuencia de células T efectoras de memoria (TEM) para todos los tipos de cáncer de células T CD4+ (izquierda) y CD8+ (derecha) usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer los estimuladores utilizados. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo, $*p<0,05$.

La Figura 49 muestra la frecuencia de células T CD8+ para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo, $*p<0,05$, $**p<0,01$.

La Figura 50 muestra el número de células T CD8+ viables por fragmento tumoral para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$.

La Figura 51 muestra la frecuencia de células T CD4+ para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo, $*p<0,05$, $**p<0,01$.

La Figura 52 muestra la frecuencia de células NK para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo, $*p<0,05$, $**p<0,01$.

La Figura 53 muestra las frecuencias de células T (CD3+) y NK (CD3- CD56+) para el cáncer de cabeza y cuello usando IL-2 +/- urelumab (Ure) bajo (2 $\mu\text{g/ml}$) con OKT3 (30 ng/ml), urelumab medio (10 $\mu\text{g/ml}$) con OKT3 (30 ng/ml), pembrolizumab (Pembro), Ipilimumab (Ipi).

La Figura 54 muestra la frecuencia de células TCD8+ para el cáncer de cabeza y cuello usando IL-2 +/- urelumab (Ure) bajo (2 $\mu\text{g/ml}$) con OKT3 (30 ng/ml), urelumab medio (10 $\mu\text{g/ml}$) con OKT3 (30 ng/ml), pembrolizumab (Pembro), Ipilimumab (Ipi).

La Figura 55 muestra la frecuencia de células CD3+, células NK, células CD8+ y células CD4+ para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S sin (barras blancas) y con (barras negras) retardo temporal. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo.

La Figura 56 muestra la frecuencia de LAG-3 en células CD4+ (barras blancas) o CD8+ (barras negras) para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo, $*p<0,05$.

La Figura 57 muestra la frecuencia de LAG-3 en células CD4+ o CD8+ para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S sin (barras blancas) o con (barras negras) retardo temporal. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo.

La Figura 58 muestra la frecuencia de CD28 en células CD8+ para todos los tipos de cáncer usando IL-2 +/- TME-S. Consultar la tabla 43 para conocer el estimulador específico de cada grupo. Estadísticas realizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. $p>0,05$ se consideró no significativo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - uno o más moduladores inmunitarios revigorizan ex vivo células T agotadas

Paso 1.1: Efecto de los moduladores inmunitarios individuales

a. El tejido tumoral extirpado que contiene TIL de varios pacientes se disecciona en 30-50 fragmentos tumorales por cm³ de tejido y se transfiere a placas de cultivo celular de 24 pocillos. 2 ml de medio de cultivo celular que contiene 6000 IU/ml de IL-2 y cualquiera de ninguna concentración (valor de referencia) o una concentración baja, media o alta de cada uno de los inmunomoduladores enumerados en la Tabla 1.

b. Las placas de cultivo celular se incuban a 37°C, 5% de CO₂ donde el medio de cultivo celular se cambia con frecuencia. Los cultivos celulares no deben aumentar de $1,5 \times 10^6$ células por pocillo y deben dividirse en nuevos pocillos.

c. Transcurridos varios días, se recogen las células, se cuentan para determinar la cantidad y la viabilidad y el fenotipo se analizan por citometría de flujo

Paso 1.2 efecto del cobloqueo y/o bloqueo/estimulación de PD1

a. Como el bloqueo de PD1 está claramente identificado como la vía clave para revigorizar las células T agotadas, se prepara y realiza un nuevo experimento que incluye IL-2, la concentración óptima de PD1 y los moduladores inmunitarios restantes enumerados en la Tabla 1, y las combinaciones específicas con IL-2 enumeradas en las Tablas 2-21, como se ha indicado anteriormente.

Paso 1.3 Efecto del cobloqueo y/o bloqueo/estimulación de CTLA4

a. Como el bloqueo de CTLA4 está claramente identificado como vía clave para revigorizar las células T agotadas, se configura y realiza un nuevo experimento que incluye IL-2, la concentración óptima de PD1 y los moduladores inmunitarios restantes enumerados en la Tabla 1, y las combinaciones específicas con IL-2 enumeradas en las Tablas 22-41, como se ha indicado anteriormente.

Paso 2: Posibilidad de ajustar aún más la concentración de inmunomoduladores.

Paso 3: Comprensión de los efectos combinatorios

a. Se prepara un nuevo experimento de manera similar usando los inmunomoduladores con mejores resultados a la concentración óptima del primer experimento en un enfoque combinatorio para determinar posibles efectos sinérgicos añadiendo varios inmunomoduladores simultáneamente con la misma lectura descrita anteriormente.

b. Lo anterior se ejecuta en varias iteraciones revelando finalmente combinaciones con un tiempo más corto, una tasa de expansión más alta y/o un fenotipo mejorado

Paso 4: validación de la combinación óptima en pacientes frente al protocolo de fabricación de TIL estándar

a. Se realiza en paralelo la expansión inicial del cultivo de TIL en una serie de pacientes elegibles para la terapia TIL para validar los efectos en un entorno de paciente real.

Ejemplo 2 - Linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) "jóvenes" con estimuladores de TME

Este ejemplo demuestra el proceso de fabricación para la generación de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) "jóvenes" con estimuladores de TME.

Se obtuvo material tumoral de varias histologías de fuentes comerciales. Se obtuvieron catorce tumores o digeridos tumorales de pacientes independientes (3 con cáncer de ovario, 3 con melanoma metastásico, 3 con cáncer de cabeza y cuello, 2 con cáncer de pulmón, 2 con cáncer colorrectal, 1 con cáncer de cuello uterino; Tabla 42). El material tumoral criopreservado o reciente se envió a Cbio A/S en un medio estéril de congelación o transporte. El material tumoral se manipuló en una campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad.

Los TIL se prepararon como se ha descrito anteriormente en detalle en el protocolo estándar de fabricación de TIL (Friese, C. et al., El bloqueo de CTLA-4 aumenta la expansión de los linfocitos infiltrantes de tumores CD8+ reactivos a los tumores en el cáncer de ovario. Sci Rep 10, 3914 (2020); Jin, J. et al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes in Gas-permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment, Journal of Immunotherapy, 35 - Número 3 (2012)). Brevemente, los cultivos de TIL se establecieron usando fragmentos de tumores o digeridos de tumores. Los tumores se dividieron en fragmentos de 1-3 mm³ y se colocaron en una placa G-Rex de 6 pocillos (WilsonWolf; 5 fragmentos por pocillo) con 10 ml de medio completo (CM) que incluía 6000 IU/ml de IL-2 (6000 IU/ml, Clinigen) solo (valor de referencia) o en combinación con estimuladores de TME en concentraciones

bajas, medias, altas o muy altas de cada uno de los antagonistas de PD-1/PD-L1 (grupo A), antagonista de CTLA-4 (grupo B), antagonista de LAG-3 (grupo C), antagonista de TIGIT (grupo D), agonista de 4-1 BB junto con anti-CD3 (grupo J) y agonista de CD28 (grupo K) enumerados en la Tabla 43, en una incubadora a 37°C humidificada con un 5% de CO₂. Se añadió CM cada 4-5 días hasta alcanzar un volumen total de 40 ml. Posteriormente, se retiró la mitad del medio y se sustituyó por CM e IL-2 cada 4-5 días. Los cultivos de TIL procedentes de digeridos tumorales se iniciaron cultivando suspensiones unicelulares (5×10^5 /ml) obtenidas mediante digestión enzimática durante la noche en placas de 96 pocillos de fondo plano en 250 µl de CM e IL-2 (6000 IU/ml, Clinigen) en una incubadora a 37°C humidificada con un 5% de CO₂. Se retiró la mitad del medio y se sustituyó por CM cada 2-3 días.

El CM consistía en RPMI1640 con GlutaMAX, 25 mM HEPES pH 7,2 (Gibco), 10% de suero AB humano inactivado por calor (Sigma-Aldrich), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco) y 1,25 µg/ml de Fungizone (Bristol-Myers Squibb).

Este ejemplo demuestra la generación de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) "jóvenes" con estimuladores de TME que tienen una edad de 10-28 días.

Ejemplo 3 - Análisis del fenotipo de cultivos "jóvenes" de TIL con estimuladores de TME

Este ejemplo demuestra el análisis del fenotipo de cultivos "jóvenes" de TIL con estimuladores de TME realizado como se describe en el ejemplo 2.

Cuando se recogieron los cultivos designados para la generación de TIL jóvenes, su fenotipo se evaluó mediante citometría de flujo.

El fenotipo de los TIL se determinó evaluando la viabilidad y el subconjunto CD3+, el subconjunto CD3+CD8+, el subconjunto CD3+CD4+ y el subconjunto NK tanto en frecuencia como en recuento celular absoluto. Además, se evaluó el estado de diferenciación, el estado de activación, la expresión de marcadores de agotamiento y la senescencia de los TIL. Se realizó citometría de flujo usando los siguientes marcadores:

Panel de TIL 1: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD56, CCR7, FVS780, BTLA, LAG-3, PD-1, TIM-3
Panel de TIL 2: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD56, CCR7, FVS780, CD-27, CD28, CD57, CD69

Brevemente, se lavaron aproximadamente $0,5 \times 10^6$ TIL jóvenes por panel y luego se incubaron con anticuerpos titulados (BD Biosciences, Tabla 45) y tampón de tinción brillante (BD Biosciences) durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con PBS y se analizaron directamente mediante citometría de flujo (CytoFLEX, Beckman Coulter).

Este ejemplo demuestra el análisis del fenotipo de cultivos de TIL "jóvenes" con estimuladores de TME.

Ejemplo 4 - Los estimuladores de TME aumentaron la tasa de éxito de la expansión de TIL ex vivo

Este ejemplo demostró que se aumentó la tasa de éxito de la expansión de TIL ex vivo cuando se añadieron estimuladores de TME al medio de cultivo cuando se iniciaron los cultivos de TIL realizados como se describe en el ejemplo 2.

La tasa de éxito de la expansión de TIL se investigó determinando el número de células por fragmento tumoral al recoger los cultivos de TIL. Se estableció 5×10^4 TIL/fragmento como un umbral de para el cultivo satisfactorio de TIL.

La determinación de la tasa de éxito de la expansión de TIL demostró que las tasas de éxito de los cultivos de TIL aumentaron cuando se añadieron estimuladores de TME a los cultivos de TIL "jóvenes" (avelumab 68%, relatlimab 70%, tiragolumab 76,5%, pembrolizumab 82,1%, ipilimumab 88,5%, theralizumab 90,9%, nivolumab 92,3% y urelumab/OKT3 100%) en comparación con los cultivos de referencia 61,5%, ilustrados en las Figuras 2 y 3.

Agrupando los estimuladores del TME de acuerdo con sus objetivos, el ejemplo también demostró que añadir inhibidores del grupo C (70%, inhibidores de LAG-3), del grupo A (76,3%, incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1), del grupo D (76,5%, inhibidores de TIGIT), del grupo B (88,5%, inhibidores de CTLA-4 y su ligando), grupo K (90,9%, agonista de CD28) y grupo J (96,3%, agonista de 4-1BB junto con anti-CD3) también aumentaron la tasa de éxito de los cultivos de TIL en comparación con los cultivos de referencia al 61,5%, ilustrado en las Figuras 4 y 5.

Este ejemplo demuestra que la tasa de éxito de la expansión de TIL ex vivo aumentó cuando se añadieron estimuladores de TME al medio de cultivo cuando se iniciaron los cultivos de TIL, en comparación con el protocolo estándar de fabricación de TIL.

Ejemplo 5 - El bloqueo de puntos de control o la coestimulación aumentaron el rendimiento de TIL y redujeron el tiempo de cultivo de los TIL

Este ejemplo demostró que aumentó el rendimiento de TIL y se redujo el tiempo de cultivo de TIL, cuando se añadieron estimuladores de TME al medio de cultivo cuando se iniciaron los cultivos de TIL, realizados como se describe en el ejemplo 2.

Se investigaron el rendimiento de los TIL y el tiempo de cultivo de los TIL al recoger los cultivos de TIL. Este análisis demostró que aumentaba el rendimiento de TIL y disminuía el tiempo de cultivo cuando se añadían estimuladores de TME al medio de cultivo al iniciar los cultivos de TIL en comparación con los TIL cultivados en IL-2 sola (Figura 6). Aquí se demostró que los estimuladores de TME de los grupos K y J aceleraron el tiempo de cultivo de TIL jóvenes por sí solos, pero también que los estimuladores de los grupos A, B y C indujeron tasas de crecimiento más rápidas de manera similar en comparación con el protocolo estándar de TIL jóvenes. Especialmente, la combinación de estimuladores del grupo J con A y/o B en combinaciones dobles o triples aceleró aún más la tasa de crecimiento.

Este ejemplo demostró que aumentó el rendimiento de TIL y se redujo el tiempo de cultivo de TIL cuando se añadieron estimuladores de TME al medio de cultivo, al iniciar los cultivos de TIL en comparación con el protocolo estándar de fabricación de TIL.

Ejemplo 6 - Diferentes concentraciones de estimuladores de TME indujeron la expansión de TIL ex vivo

Este ejemplo realizado como se describe en el ejemplo 2 demostró que el rendimiento de TIL aumentaba, cuando se añadían estimuladores de TME al medio de cultivo en diferentes concentraciones, al iniciar cultivos de TIL de varios tipos de tumores.

Se investigó la expansión del rendimiento de TIL al recoger cultivos de TIL. El primer análisis de la Figura 7 demostró que la expansión de TIL aumentó 1,15 veces, 1,85 veces y 1,53 veces en comparación con IL-2 sola, cuando se añadió una concentración baja, media o alta del antagonista de CTLA-4, ipilimumab (grupo B) al medio de cultivo, cuando se iniciaron los cultivos de TIL. Este ejemplo demostró que aumentó el rendimiento de TIL cuando se añadió el antagonista de CTLA-4 (grupo B) al medio de cultivo al iniciar los cultivos de TIL de una manera dependiente de la dosis. A pesar de que también se sabe que el antagonista de CTLA-4 usado (ipilimumab) agota las células T que expresan CTLA-4 mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), este nuevo descubrimiento sugirió cómo el agotamiento de ciertos subconjuntos de células T podría haber permitido tasas de crecimiento más rápidas para otras células T, mejorando de este modo el rendimiento general de TIL.

En la Figura 8, se demostró que cuando se añadía una concentración baja, media o alta de un antagonista de PD-1, pembrolizumab (grupo A) al medio de cultivo al iniciar los cultivos de TIL, el rendimiento de TIL mostraba una tendencia hacia un aumento dependiente de la dosis en comparación con el protocolo estándar de TIL jóvenes.

En las Figuras 9-12 se ilustra un efecto similar dependiente de la dosis en el rendimiento de TIL en comparación con el protocolo estándar de TIL jóvenes para un agonista de 4-1BB, urelumab junto con anti-CD3 (OKT3) (grupo J), un agonista de CD28, theralizumab (grupo K), un inhibidor de PD-L1, avelumab (grupo A - el ligando de PD-1), y otro inhibidor de PD-1, nivolumab (grupo A), respectivamente.

Este ejemplo 6 demuestra cómo influyeron en el crecimiento de TIL diferentes concentraciones de estimuladores de TME de manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 7 - Los estimuladores de TME en conjunto y de diferentes agrupaciones potencian el crecimiento de TIL

El Ejemplo 7 ilustrado en la Figura 13 demostró que la adición de estimuladores de TME al protocolo estándar de TIL jóvenes realizado como se describe en el Ejemplo 2 aumentó significativamente el crecimiento de TIL, lo que dio como resultado un mayor número de células viables por fragmento tumoral. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios cánceres sólidos incluyendo cáncer de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cervical, colorrectal y pulmón.

Descomponiendo los estimuladores del TME en los subgrupos subyacentes, el ejemplo también demostró que la adición de inhibidores del grupo A (incluidos inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1), del grupo B (inhibidores de CTLA-4), del grupo J (agonista 4-1BB junto con anti-CD3) y del grupo K (agonista de CD28) también aumentó significativamente el crecimiento de TIL. Aunque no fue significativo en este ejemplo, hubo una tendencia a que la adición de estimuladores del TME de los grupos C (inhibidores de LAG-3) y D (inhibidores de TIGIT) también mejorara el crecimiento de TIL.

En las Figuras 14-19, se ilustra el efecto de añadir estimuladores de TME a los cultivos iniciales de TIL de las mismas agrupaciones anteriores en cáncer de cuello uterino, melanoma, ovario, cabeza y cuello, pulmón y colorrectal, respectivamente. Aunque no fue significativo en todas las condiciones, el efecto ilustró un patrón similar entre cánceres que en el ejemplo pan-tumoral de la Figura 13, aunque el efecto y la magnitud de los estimuladores individuales en los diferentes cánceres fue variable.

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo de TIL estándar existente que permitió un protocolo de fabricación de terapia TIL más rápido.

Ejemplo 8: Los agonistas, antagonistas, reductores de células T, revigorizantes de células T y estimuladores de origen de la familia CD28 de los estimuladores de TIL aumentaron significativamente las tasas de crecimiento de TIL.

El Ejemplo 8 ilustrado en la Figura 20 demuestra que la adición de estimuladores de TME al protocolo estándar de TIL jóvenes realizado como se describe en el ejemplo 2 aumentó significativamente el crecimiento de TIL, lo que dio como resultado un mayor número de células viables por fragmento tumoral. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios cánceres sólidos, incluyendo cáncer de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cervical y pulmón.

Al descomponer los estimuladores del TME en subgrupos de acuerdo con su funcionalidad, el ejemplo también demostró que tanto los antagonistas de células T, como los agonistas, los revigorizantes, los reductores y los miembros de la familia de receptores CD28 tenían un efecto significativo en el crecimiento de TIL. Mientras que una cantidad representativa de diferentes antagonistas del TME ejemplificados aquí incluyen 2 inhibidores de PD-1 diferentes (pembrolizumab y nivolumab), 2 inhibidores de PD-L1 diferentes (avelumab y durvalumab), un inhibidor de CTLA-4 (ipilimumab), un inhibidor de TIGIT (tiragolumab), mostraron un aumento de 3-5 veces con respecto al proceso estándar de TIL jóvenes, los agonistas del TME ejemplificados aquí por estimuladores dirigidos a 4-1BB (urelumab junto con anti-CD3 (OKT3)) y CD28 (theralizumab) parecían acelerar aún más el crecimiento.

Dividir aún más los antagonistas del TME en si permiten el agotamiento de las células T reguladoras a través de la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), como el ipilimumab y el tiragolumab, o solo permiten la reinvigoración de las células T a través de la inhibición del punto de control, ambos demostraron también una mejora significativa en las tasas de crecimiento de TIL en comparación con las condiciones del protocolo de TIL jóvenes estándar, como se ilustra en la Figura 20.

Observando específicamente los estimuladores de TME originados en la familia de proteínas CD28 ejemplificada aquí por inhibidores de PD-1, CTLA-4 y CD28 o sus ligandos originados en la familia de proteínas B7 ejemplificada aquí por dos inhibidores diferentes de PD-L1, se demostró que también aumentaban significativamente el crecimiento de TIL en comparación con el protocolo estándar de TIL jóvenes. Aunque no se muestran aquí, otros receptores expresados en células T procedentes de la familia de proteínas CD28, como BTLA e ICOS, podrían tener un efecto estimulador del crecimiento similar para los cultivos de TIL jóvenes.

En las Figuras 21-26, se ilustró el efecto de añadir estimuladores de TME a los cultivos iniciales de TIL de las mismas agrupaciones que las anteriores en este ejemplo en cánceres de melanoma, ovario, pulmón, cuello uterino, colorrectal y cabeza y cuello, respectivamente. Aunque no fue significativo en todas las condiciones, el efecto ilustró un patrón similar entre cánceres que en el ejemplo pan-tumoral de la Figura 20, aunque el efecto y la magnitud de los estimuladores individuales en los distintos cánceres fue variable.

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME que antagonizaban receptores expresados en células T (o sus ligandos), agonizaban receptores expresados en células T, revigorizaban células T agotadas (o sus ligandos), agotando las células T reguladoras y/o dirigiéndose a receptores expresados en células T procedentes de la familia CD28 (o sus ligandos procedentes de la familia de proteínas B7) en el paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo estándar de TIL existente que permitió un protocolo de fabricación de terapia TIL más rápido.

Ejemplo 9 - Los antagonistas del estimulador del TME dirigidos a receptores expresados en células T o sus ligandos demostraron un efecto estimulador del crecimiento de TIL similar.

El Ejemplo 9 ilustrado en la Figura 27 demostró que la adición de estimuladores de TME al protocolo estándar de TIL jóvenes realizado en el ejemplo 2 mejoró significativamente el crecimiento de TIL, lo que dio como resultado un mayor número de células viables por fragmento tumoral, ya sea estimulando un receptor expresado en células T (en este caso PD-1) o su ligando (PD-L1) expresado en células tumorales y otras células del microambiente tumoral. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios tipos de cáncer sólido, incluyendo los de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cuello uterino y pulmón. Se trataba de un ejemplo de cómo la inhibición de receptores expresados en células T que se sabe que regulan por disminución la actividad de las células

T tenía un efecto similar al de la inhibición de sus ligandos y de que ambos podían generar un efecto similar sobre el crecimiento de TIL que revigorizaba las células T agotadas y aumentaba el crecimiento de TIL jóvenes. El ejemplo de PD1/PD-L1 ejemplificaba de este modo una tendencia más general de inhibición de receptor/ligando para otros receptores expresados en células T como CTLA-4, LAG-3, TIGIT, KIR, TIM-3, BTLA y sus ligandos.

En las Figuras 28-33, se ilustró el efecto de añadir estimuladores de TME a los cultivos iniciales de TIL procedentes del protocolo estándar de fabricación de TIL, del grupo PD-1 o del grupo PD-L1 en cáncer de ovario, melanoma, pulmón, cabeza y cuello, colorrectal y cuello uterino, respectivamente. Aunque no fue significativo en todas las condiciones, el efecto ilustró un patrón similar entre cánceres que el del ejemplo pan-tumoral PD-1/PD-L1 de la Figura 27.

Ejemplo 10 - Los estimuladores de TME de diferentes fabricantes demostraron un efecto estimulador del crecimiento de TIL similar

El Ejemplo 10 ilustrado en la Figura 34 demuestra que la adición de estimuladores de TME de diferentes fabricantes tuvo un efecto similar cuando se añadió al protocolo estándar de TIL jóvenes realizado como se describe en el ejemplo 2, que aumentó significativamente el crecimiento de TIL y dio como resultado un mayor número de células viables por fragmento tumoral independientemente del origen de fabricación. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios cánceres sólidos, incluyendo cáncer de ovario, melanoma, cabeza y cuello, y cervical.

En este ejemplo se probaron dos inhibidores de PD-1 (pembrolizumab, Merck Sharp Dome y nivolumab, Bristol Myers Squibb) y dos inhibidores de PD-L1 (avelumab, Merck KgaA y durvalumab, AstraZeneca). Todos los estimuladores de TME diferentes mostraron una mejora significativa con respecto al protocolo estándar de TIL jóvenes en la capacidad de acelerar el crecimiento de TIL. Hubo una tendencia a que los cuatro anticuerpos diferentes mostraran efectos similares en comparación con el grupo A, así como entre los inhibidores individuales.

Este fue un ejemplo de cómo los estimuladores TME de varios fabricantes en general eran intercambiables y podían usarse para optimizar el proceso de fabricación de TIL jóvenes.

En las Figuras 35-38, se ilustra el efecto de añadir inhibidores del grupo A de diferentes fabricantes a los cultivos iniciales de TIL en cáncer de ovario, melanoma, cabeza y cuello, y cuello uterino, respectivamente. Aunque no es significativo en todas las condiciones, el efecto ilustró un patrón similar entre cánceres que el del ejemplo pan-tumoral de la Figura 34.

Ejemplo 11 - Las combinaciones de estimuladores de TME mejoraron aún más el crecimiento de TIL jóvenes

Este ejemplo realizado como se describe en el ejemplo 2 demostró que el rendimiento de TIL aumentó en comparación con el protocolo estándar de fabricación de TIL, cuando se añadieron al medio de cultivo estimuladores de TME en varias combinaciones, al iniciar cultivos de TIL de varios tipos de tumores.

Se investigó el rendimiento de TIL al recoger los cultivos de TIL. El primer análisis ilustrado en la Figura 39 demostró que la expansión de TIL aumentaba significativamente cuando se añadían estimuladores de TME del grupo A (inhibidor de PD-1 o sus ligandos), del grupo B (inhibidor de CTLA-4), o cuando se añadían tanto del grupo A como del B en comparación con el protocolo estándar de TIL jóvenes. Se observó una tendencia, aunque no significativa, a que la adición conjunta de estimuladores del TME de los grupos A y B mejoraba aún más las tasas de crecimiento de los TIL.

En otro análisis ilustrado en la Figura 40, un agonista de 4-1BB, urelumab junto con anti-CD3 (OKT3) (grupo J), ya sea solo, o en combinación con un inhibidor de CTLA-4, ipilimumab (grupo B), o en combinación con un inhibidor de PD-1, pembrolizumab (grupo A), o en una combinación triple de ambos, ipilimumab y pembrolizumab, mostraron todos un crecimiento muy fuerte de TIL en células viables por fragmento tumoral de varios cánceres.

En la Figura 41 se investigó el efecto de un retardo temporal en la adición de urelumab/OKT3 al cultivo de TIL jóvenes. Aquí, la combinación triple de urelumab/OKT3, ipilimumab y pembrolizumab añadida al cultivo inicial de TIL jóvenes en el día cero (parte izquierda de la Figura) se comparó con la adición de ipilimumab y pembrolizumab y la espera de 2 días para añadir urelumab/OKT3 con retardo temporal (parte derecha de la Figura). No hubo diferencias significativas entre las dos condiciones y ambas mostraron un crecimiento muy fuerte de los TIL.

En la Figura 42, se investigó el efecto de añadir teralizumab solo (parte izquierda de la Figura) o en combinación con ipilimumab y pembrolizumab al cultivo inicial de TIL jóvenes. Aunque no fue significativa, se observó una tendencia a que la combinación triple indujera una tasa de crecimiento más rápida en los TIL jóvenes en comparación con el teralizumab solo.

Ejemplo 12 - Los estimuladores del TME solos o en combinación aumentaron la tasa de éxito de la expansión de TIL ex vivo

Este ejemplo demostró que aumentó la tasa de éxito de la expansión de TIL ex vivo, cuando se añadieron estimuladores de TME al medio de cultivo durante el inicio del cultivo de TIL realizado como se describe en el ejemplo 2.

La tasa de éxito de la expansión de TIL se investigó determinando el número de células por fragmento tumoral al recoger los cultivos de TIL. Se estableció un umbral de 5×10^4 TIL/fragmento para el cultivo satisfactorio de TIL.

La determinación de la tasa de éxito de la expansión de TIL demostró que las tasas de éxito de los cultivos de TIL aumentaron cuando se añadieron estimuladores de TME de diferentes grupos a los cultivos de TIL "jóvenes", ya sea solos o en combinaciones (grupo A 76,3%, grupo B 88,5%, grupo J 100,0%, grupo A+B 83,3%, grupo B+J 100,0%, grupo A+J 100,0%, y grupo A+B+J triple combo 96,0%) en comparación con los cultivos de referencia 61,5%, ilustrados en la Figura 43.

Este ejemplo demostró que la tasa de éxito de la expansión de TIL ex vivo aumentaba cuando se añadían estimuladores de TME solos o en combinaciones al medio de cultivo al iniciar los cultivos de TIL, en comparación con el protocolo estándar de fabricación de TIL.

Ejemplo 13 - Los estimuladores del TME en su conjunto, de diferentes agrupaciones y en combinaciones potencian la frecuencia y el número de células T

El ejemplo 13 ilustrado en las Figuras 44-47 demostró que la adición de estimuladores de TME al protocolo estándar de TIL jóvenes realizado como se describe en el ejemplo 2 y la tinción de células T usando anticuerpo de citometría de flujo anti-CD3 como se describe en el ejemplo 3 mejoró significativamente el crecimiento de TIL que dio como resultado una mayor frecuencia de células T (Figura 44) y un mayor número de células T viables por fragmento tumoral (Figura 46) en comparación con IL-2 sola. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios cánceres sólidos incluyendo cáncer de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cervical, colorrectal y pulmón.

Descomponiendo los estimuladores del TME en los subgrupos subyacentes, el ejemplo también demostró que la adición de inhibidores del grupo A (incluyendo los inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1) o del grupo B (inhibidores de CTLA-4 y su ligando), también aumentaba significativamente la frecuencia de células T en comparación con la IL-2 sola (Figura 45), al revigorizar las células T. Como las células T que tienen una mayor afinidad por los antígenos tumorales podrían tener una mayor tendencia a agotarse, esto puede llevar a la expansión de más células T reactivas al tumor. Además, el ejemplo también demostró que la adición de estimuladores de TME del grupo B también aumentó significativamente la frecuencia de células T en comparación con el grupo J (agonista 4-1BB junto con anti-CD3) o una combinación de los grupos J, A y B (Figura 45).

Descomponiendo los estimuladores del TME en los subgrupos subyacentes, el ejemplo también demostró que la adición de inhibidores del grupo A (incluyendo los inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1), del grupo B (inhibidores de CTLA-4 y su ligando), del grupo K (agonistas de CD28 y del grupo J (agonista 4-1 BB junto con anti-CD3) también aumentó significativamente el número de células T viables por fragmento tumoral en comparación con IL-2 sola (Figura 47). Además, el ejemplo también demostró que la adición de combinaciones de estimuladores de TME de los grupos J, A y B también aumentó significativamente el número de células T viables por fragmento tumoral en comparación con el grupo A, el grupo B o una combinación de los grupos A y B (Figura 47). Además, hay una tendencia a más células T viables por fragmento cuando se añaden combinaciones de estimuladores de TME del grupo J, A y B en comparación con la adición de estimuladores de TME del grupo J solo (Figura 47).

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME al paso de fabricación de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo estándar de TIL existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una mayor frecuencia de células T y, un mayor número de células T viables.

Ejemplo 14 - Los estimuladores del TME en su conjunto, de diferentes agrupaciones y en combinaciones mantienen la frecuencia de células T con memoria efectoras

El ejemplo 14 ilustrado en la Figura 48 demostró que la adición de estimuladores de TME al protocolo de fabricación de TIL jóvenes estándar realizado como se describe en el ejemplo 2 y la tinción de células T usando anticuerpos de citometría de flujo anti-CD3, anti-CD45RA y anti-CCR7 como se describe en el ejemplo 3 aumentó significativamente la frecuencia de células T con memoria efectoras en células T CD4+ y aumentó ligeramente la frecuencia de células T con memoria efectoras en células T CD8+ en comparación con IL-2 sola. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios cánceres sólidos incluyendo cáncer de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cervical, colorrectal y pulmón.

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME al paso de fabricación de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa respecto al protocolo estándar de TIL existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia comparable de células T efectoras de memoria.

5 **Ejemplo 15 - Los estimuladores de TME en combinación aumentan la frecuencia y el número de células T CD8+.**

10 El ejemplo 15 ilustrado en la Figura 49-50 demostró que la adición de una combinación de estimuladores de TME del grupo J (agonista de 4-1BB junto con anti-CD3) grupo A (incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1) y grupo B (inhibidores de CTLA-4 y ligando) al protocolo de fabricación de TIL jóvenes estándar realizado como se describe en el ejemplo 2 y tinción de células T usando anticuerpos de citometría de flujo anti-CD3 y anti-CD8 como se describe en el ejemplo 3 mejoró significativamente el crecimiento de células T CD8+ que dio como resultado una frecuencia (Figura 49) y número (Figura 50) significativamente mayores de células T CD8+ en comparación con IL-2 sola. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios cánceres sólidos incluyendo 15 cáncer de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cervical, colorrectal y pulmón.

El ejemplo también demostró que la adición de una combinación de estimuladores del TME del grupo J (agonista 4-1BB junto con anti-CD3), del grupo A (incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1) y del grupo B (inhibidores de CTLA-4) a los TIL jóvenes estándar mostró una tendencia a aumentar el crecimiento de células T CD8+ en comparación con la adición de estimuladores del TME del grupo A, del grupo B o del grupo J solos (Figura 49). Además, el ejemplo también demostró que la adición de una combinación de estimuladores de TME del grupo J, el grupo A y el grupo B aumentó significativamente el número de células T CD8+ viables en comparación con el grupo A o el grupo B solos y mostró una tendencia a aumentar el número de células T CD8+ viables en comparación con el grupo J solo (Figura 50).

25 Con anterioridad se ha asociado una frecuencia aumentada de células T CD8+ en el producto de infusión de TIL con un resultado clínico beneficioso de la terapia con TIL en pacientes con melanoma metastásico (Radvanyi, L. G. et al., Subconjuntos específicos de linfocitos predicen la respuesta a la terapia celular adoptiva utilizando linfocitos autólogos expandidos que se infiltran en el tumor en pacientes con melanoma metastásico. Clin. Cancer Res. 18, 6758-6770 (2012)). Por tanto, los métodos que aumentan la frecuencia de células T CD8+ podrían inducir respuestas 30 clínicas en pacientes con cáncer que no responden a los TIL fabricados mediante el protocolo estándar de TIL.

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME solos y en combinaciones al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo de fabricación de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una mayor frecuencia de células T CD8+.

Ejemplo 16 - La combinación de estimuladores del TME reduce la frecuencia de células T CD4+.

40 El ejemplo 16 ilustrado en la Figura 51 demostró que la adición de una combinación de estimuladores de TME del grupo J (agonista 4-1BB junto con anti-CD3) grupo A (incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1) y grupo B (inhibidores de CTLA-4) al protocolo de TIL joven estándar realizado como se describe en el ejemplo 2 y tinción de células T usando anticuerpos de citometría de flujo anti-CD3 y anti-CD4 como se describe en el ejemplo 3 redujo significativamente el crecimiento de células T CD4+ que dio como resultado una frecuencia significativamente reducida de células T CD4+ en comparación con IL-2 sola (Figura 51). Esto se ilustró usando un número representativo 45 de fragmentos tumorales de varios cánceres sólidos incluyendo cáncer de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cervical, colorrectal y pulmón.

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo estándar de fabricación de TIL existente que permitió la 50 generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia reducida de células T CD4+.

Ejemplo 17 - Los estimuladores de TME de diferentes grupos reducen la frecuencia de las células NK

55 El ejemplo 17 ilustrado en la Figura 52 demostró que la adición de estimuladores de TME del grupo A (incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1) o del grupo B (inhibidores de CTLA-4) al protocolo de TIL jóvenes estándar realizado como se describe en el ejemplo 2 y la tinción de células NK usando anticuerpos de citometría de flujo anti-CD3 y anti-CD56 como se describe en el ejemplo 3 revigorizó significativamente las células T dando como resultado una frecuencia reducida de células NK en comparación con IL-2 sola. Esto podría llevar a la expansión de más células T reactivas al tumor. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios 60 cánceres sólidos incluyendo cáncer de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cervical, colorrectal y pulmón.

Además, el ejemplo demostró que la adición de estimuladores de TME del grupo B mostraba una tendencia a la reducción de la frecuencia de células NK en comparación con el grupo J (agonista 4-1BB junto con anti-CD3) y el grupo K (agonistas CD28).

65

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo de fabricación de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia reducida de células NK.

5 Ejemplo 18 - Los estimuladores del TME de diferentes grupos o en combinación afectan a la frecuencia de las células NK y T en total y de las células T CD8+ específicamente.

El ejemplo 18 ilustrado en las Figuras 53 y 54 demostró que la adición de urelumab/OKT3 (grupo J) solo o en combinación con pembrolizumab (grupo A) o ipilimumab y pembrolizumab (grupo B+A) al protocolo estándar de TIL jóvenes realizado como se describe en el ejemplo 2 y la tinción de células NK y células T usando anticuerpos de citometría de flujo anti-CD3, anti-CD56 y anti-CD8 como se describe en el ejemplo 3 revigorizaron las células NK dando como resultado un aumento de la frecuencia de células NK y una reducción de la frecuencia de células T en comparación con IL-2 sola (Figura 53) en una muestra de cáncer de cabeza y cuello. Esta revigorización de las células NK se inhibió añadiendo ipilimumab además de urelumab/OKT3 al cultivo de TIL que revigorizaba las células T dando como resultado una frecuencia disminuida de células NK y una frecuencia aumentada de células T en comparación con la adición de urelumab/OKT3 (grupo J) solo o en combinación con pembrolizumab (grupo A) o ipilimumab y pembrolizumab (grupo B+A) al protocolo de fabricación de TIL jóvenes estándar. Esto se ilustró usando una muestra representativa de cáncer de cabeza y cuello.

Además, el ejemplo demostró que la adición de urelumab/OKT3 (grupo J) e ipilimumab (grupo B) redujo la frecuencia de células T CD8+ en comparación con urelumab/OKT3 solo, urelumab/OKT3 y pembrolizumab (grupo A) y urelumab/OKT3, ipilimumab y pembrolizumab (Figura 54).

Por lo tanto, el ejemplo demostró que añadir urelumab/OKT3 (grupo J), ipilimumab (grupo B) y pembrolizumab (grupo A) podría ser favorable en comparación con urelumab/OKT3 e ipilimumab únicamente.

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo estándar existente de fabricación de TIL que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia reducida de células NK pero una frecuencia aumentada de células T CD8+.

Ejemplo 19 - Los estimuladores del TME en combinación añadidos con retardo del tiempo aumentan la frecuencia de células T CD3+ y CD8+ y reducen la frecuencia de células NK y células T CD4+.

El ejemplo 19 ilustrado en la Figura 55 demostró que la adición de una combinación de estimuladores de TME del grupo A (incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1) y del grupo B (inhibidores de CTLA-4 el día 0 y un estimulador de TME del grupo J (agonista 4-1BB junto con anti-CD3) el día 2 al protocolo de TIL jóvenes estándar realizado como se describe en el ejemplo 2 y tinción de células T usando anticuerpos de citometría de flujo anti-CD3, anti-CD56, anti-CD8 y anti-CD4 como se describe en el ejemplo 3 mejoró el crecimiento de células T y células T CD8+, lo que dio como resultado un aumento de la frecuencia de células T en total (CD3+) y células T CD8+ (Figura 55) y una reducción de la frecuencia de células NK y células T CD4+ en comparación con la adición de estimuladores de TME de los mismos grupos (A, B y J) en el día 0. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios cánceres sólidos, incluyendo cáncer de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cervical, colorrectal y pulmón. El retardo parece permitir un mayor efecto de los antagonistas de los grupos A y B en el agotamiento de las células T CD-4+ reguladoras y en la revigorización de las células T CD-8+ antes de la adición de los agonistas del grupo J.

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME con un retardo temporal al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo de fabricación de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una frecuencia aumentada de células T en total, células T CD8+ y una frecuencia reducida de células NK y células T CD4+.

Ejemplo 20 - Los estimuladores del TME solos o en combinación aumentan la frecuencia de células T LAG3+.

El ejemplo 20 ilustrado en las Figuras 56 y 57 demostró que la adición de estimuladores de TME solos o en combinación del grupo A (incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1), grupo B (inhibidores de CTLA-4), grupo K (agonistas de CD28) o grupo J (agonista de 4-1BB junto con anti-CD3) al protocolo estándar de TIL jóvenes realizado como se describe en el ejemplo 2 y tinción de células T usando anticuerpos de citometría de flujo anti-CD3 anti-CD8, anti-CD4 y anti-LAG-3 como se describe en el ejemplo 3 mejoraron la revigorización de las células T específicas de tumor lo que dio como resultado un aumento de la frecuencia de células T LAG-3+ tanto en células T CD4+ como CD8+ (Figura 56) en comparación con IL-2 sola. Especialmente la frecuencia de células T CD4+ LAG-3+ fue significativamente mayor cuando se añadieron estimuladores de TME del grupo A y B. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios cánceres sólidos incluyendo cáncer de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cervical, colorrectal y pulmón.

Además, el ejemplo demostró que la adición de una combinación de estimuladores de TME del grupo A (incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1), del grupo B (inhibidores de CTLA-4) o del grupo J (agonista 4-1 BB junto con anti-CD3) en un retardo temporal como se describe en el ejemplo 19 en comparación con la adición de estimuladores de TME en combinación de los grupos A, B y J mostró una tendencia a una mayor revigorización de células T CD8+ específicas de tumor lo que dio como resultado una mayor frecuencia de células T CD8+ LAG-3+ (Figura 57).

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa con respecto al protocolo de fabricación de TIL estándar existente que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una mayor frecuencia de células T LAG-3+ específicas del tumor. Como se sabe que LAG-3 es un marcador de agotamiento de células T y que las células T que tienen una mayor afinidad por los antígenos tumorales generalmente tienen una mayor tendencia a agotarse, la expansión de clones de células T CD8+ LAG-3+ puede llevar a una mayor proporción de células T reactivas al tumor, lo que posiblemente lleve a un mejor resultado clínico de este enfoque novedoso de la terapia con TIL.

Ejemplo 21 - Los estimuladores de TME aumentaron la frecuencia de células T CDS con un fenotipo más joven siendo CD28+.

El ejemplo 21 ilustrado en la Figura 58 demostró que la adición de estimuladores de TME solos o en combinación del grupo A (incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1), grupo B (inhibidores de CTLA-4), grupo K (agonistas de CD28) o grupo J (agonista de 4-1BB junto con anti-CD3) al protocolo estándar de TIL jóvenes realizado como se describe en el ejemplo 2 y tinción de células T usando anticuerpos de citometría de flujo anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD28 como se describe en el ejemplo 3 mejoró la expansión de células T con un fenotipo más joven que dio como resultado una mayor frecuencia de células T CD8+ CD28+ (Figura 58) en comparación con IL-2 sola. Esto se ilustró usando un número representativo de fragmentos tumorales de varios cánceres sólidos incluyendo cáncer de ovario, cabeza y cuello, colorrectal, melanoma, cervical, colorrectal y pulmón.

Además, el ejemplo demostró que la adición de una combinación de estimuladores de TME del grupo A (incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1), del grupo B (inhibidores de CTLA-4) o del grupo J (agonista 4-1BB junto con anti-CD3) en comparación con la adición de estimuladores de TME del grupo A o del grupo B solos mostraba una tendencia a una mayor expansión de células T con un fenotipo más joven que daba como resultado una mayor frecuencia de células T CD8+ CD28+ (Figura 58).

Además, el ejemplo demuestra que la adición de una combinación de estimuladores de TME del grupo A (incluyendo inhibidores de PD1 y su ligando PD-L1), grupo B (inhibidores de CTLA-4) y grupo J (agonista 4-1BB junto con anti-CD3) con retardo temporal como se describe en el ejemplo 19 en comparación con la adición de estimuladores de TME del grupo A o grupo B solos o una combinación de estimuladores de TME del grupo A, grupo B y grupo J sin retardo temporal mostraron una tendencia a una mayor expansión de células T con un fenotipo más joven que resultó en una mayor frecuencia de células T CD8+ CD28+ (Figura 58).

Resumiendo este ejemplo, la adición de estimuladores de TME al paso de procesamiento de TIL jóvenes proporcionó una mejora novedosa sobre el protocolo estándar existente de fabricación de TIL que permitió la generación de un producto de TIL que contenía una mayor frecuencia de células T CD8+ con un fenotipo más joven que expresaba CD28.

REIVINDICACIONES

1. Linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer, el tratamiento comprendiendo los pasos de:

- a) cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL de un tumor extirpado de un mamífero
- b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprenda IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL, en donde el uno o más estimuladores de TME comprende por lo menos una sustancia del grupo B seleccionada entre una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab,
- (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de los TIL con IL-2 adicional, anticuerpo anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de los TIL, en donde la tercera población de los TIL es una población terapéutica; y
- d) después de administrar quimioterapia linfodeplectora no mieloablativa, administrar al mamífero la población terapéutica de células T, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero.

2. Linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso en la promoción de la regresión de un cáncer en un sujeto con cáncer, la regresión comprendiendo los pasos de:

- a) cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL de un tumor extirpado de un mamífero
- b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL, en donde el uno o más estimuladores de TME comprende por lo menos una sustancia del grupo B seleccionada entre una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab,
- (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2 adicional, anticuerpo anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de los TIL es una población terapéutica; y
- d) después de administrar quimioterapia linfodeplectora no mieloablativa, administrar al mamífero la población terapéutica de células T, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero.

3. Un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en una población terapéutica de los TIL que comprende:

- a) cultivar células T autólogas obteniendo una primera población de TIL de un tumor extirpado de un mamífero
- (b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y uno o más estimuladores de TME para producir una segunda población de TIL, en donde el uno o más estimuladores de TME comprenden por lo menos una sustancia del grupo B que se selecciona de una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab, y
- (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de los TIL con IL-2 adicional, anticuerpo anti-CD3, y células presentadoras de antígeno (APC), para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de los TIL es una población terapéutica.

4. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o el método de la reivindicación 3, en donde el uno o más estimuladores de TME comprenden por lo menos una sustancia del grupo A seleccionada entre una o más del grupo que consiste en pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab, sym021, atezolizumab, avelumab y durvalumab, y una sustancia del grupo B seleccionada entre una o más del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab.

5. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, o el método de la reivindicación 4, que comprenden además una o más sustancias del grupo J seleccionadas entre una o más del grupo que consiste en urelumab y utomilumab.

6. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, o el método de la reivindicación 5, en donde el grupo J se usa en combinación con una sustancia anti-CD3.

7. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 4-6, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en donde la concentración de la sustancia es de 0,1 µg/ml a 300 µg/ml, como de 1 µg/ml a 100 µg/ml, como de 10 µg/ml a 100 µg/ml, como de 1 µg/ml a 10 µg/ml, como de 2-20 µg/ml.

8. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 4-7, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde los pasos (a) a (b) se realizan en el plazo de un periodo de aproximadamente 7 días a aproximadamente 28 días.

9. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones

1-2 o 4-8, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en donde el paso (c) se realiza en el plazo de un periodo de aproximadamente 7 días a aproximadamente 21 días.

- 5 10. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 4-9, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-9, en donde la población terapéutica de células T se usa para tratar un tipo de cáncer seleccionado entre los grupos que consisten en cáncer de mama, cáncer de células renales, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer de cuello uterino, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, linfoma de Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de hígado y sarcomas.
- 10 11. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 4-10, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-10, en donde el paso (c) da como resultado de 1×10^7 a 1×10^{12} células, como de 1×10^8 a 5×10^9 células, como de 1×10^9 a 5×10^9 células, como de 1×10^8 a 5×10^{10} células, como de 1×10^9 a 5×10^{11} células.
- 15 12. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2 o 4-11 o, el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-11, en donde el anticuerpo anti-CD3 es OKT3.
- 20 13. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2 o 4-12, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-12, en donde los estimuladores de TME se añaden juntos o en intervalos de tiempo, es decir, con un día de diferencia, o como con 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días de diferencia.
- 25 14. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2 o 4-13, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-13, en donde las células presentadoras de antígeno (APC) se seleccionan del grupo que consiste en células alimentadoras alogénicas, PBMC y células alimentadoras presentadoras de antígeno artificiales.

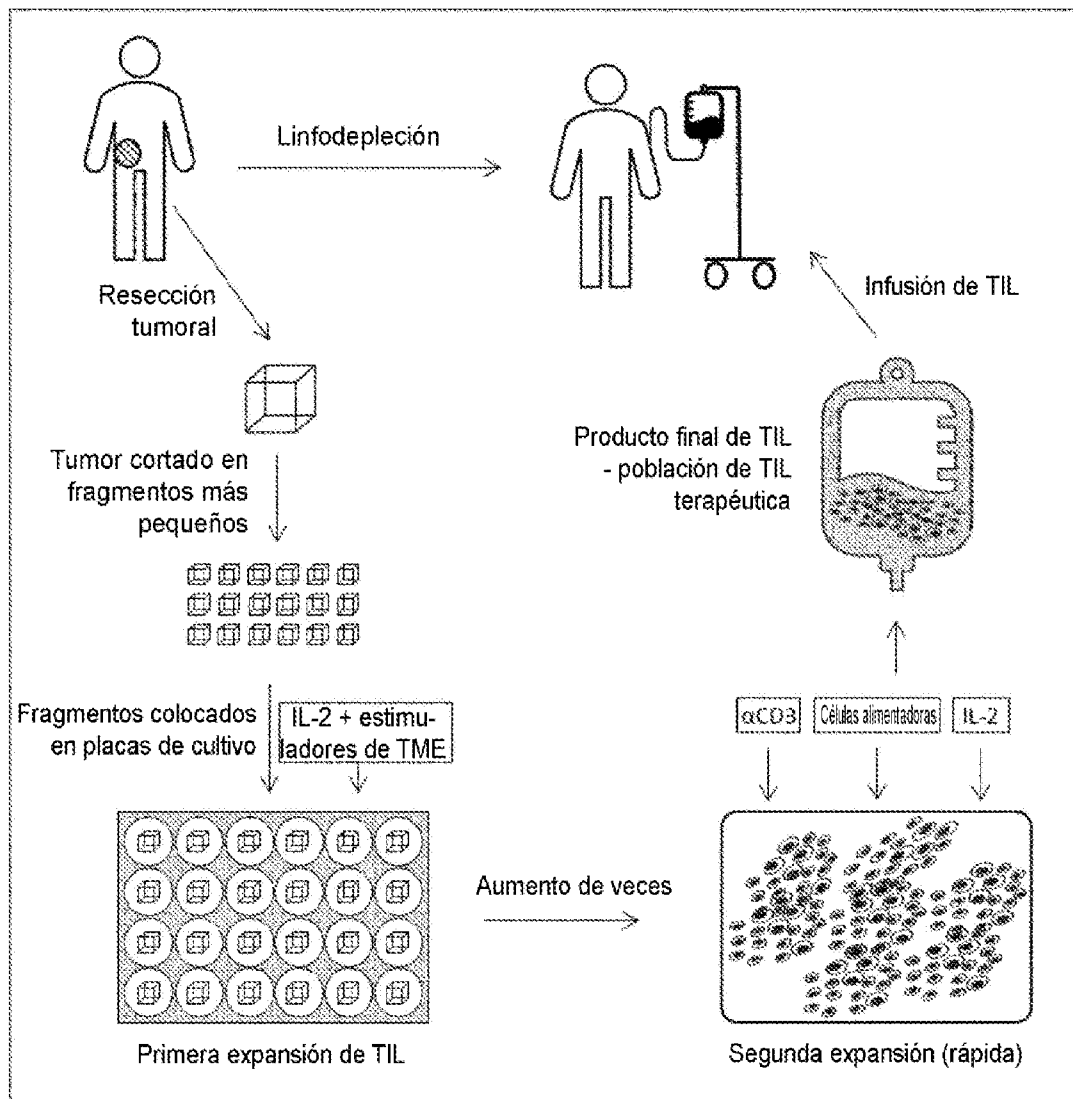


Fig. 1

Tasa de éxito de estimuladores de TME

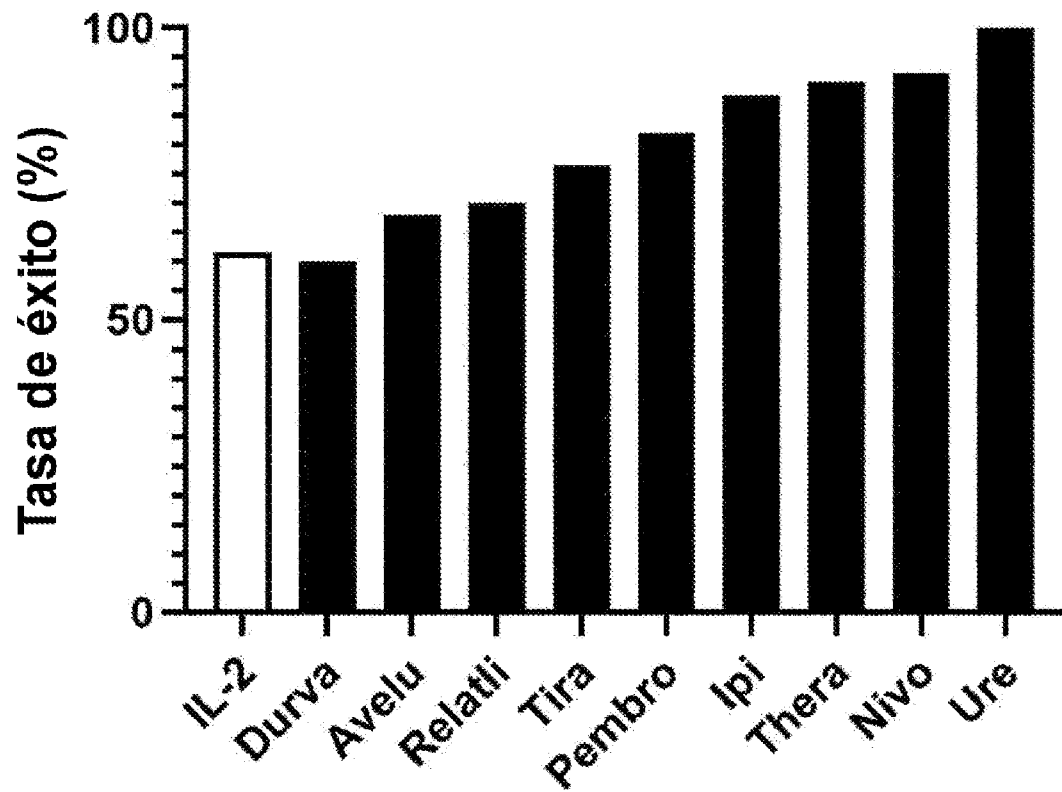


Fig 2

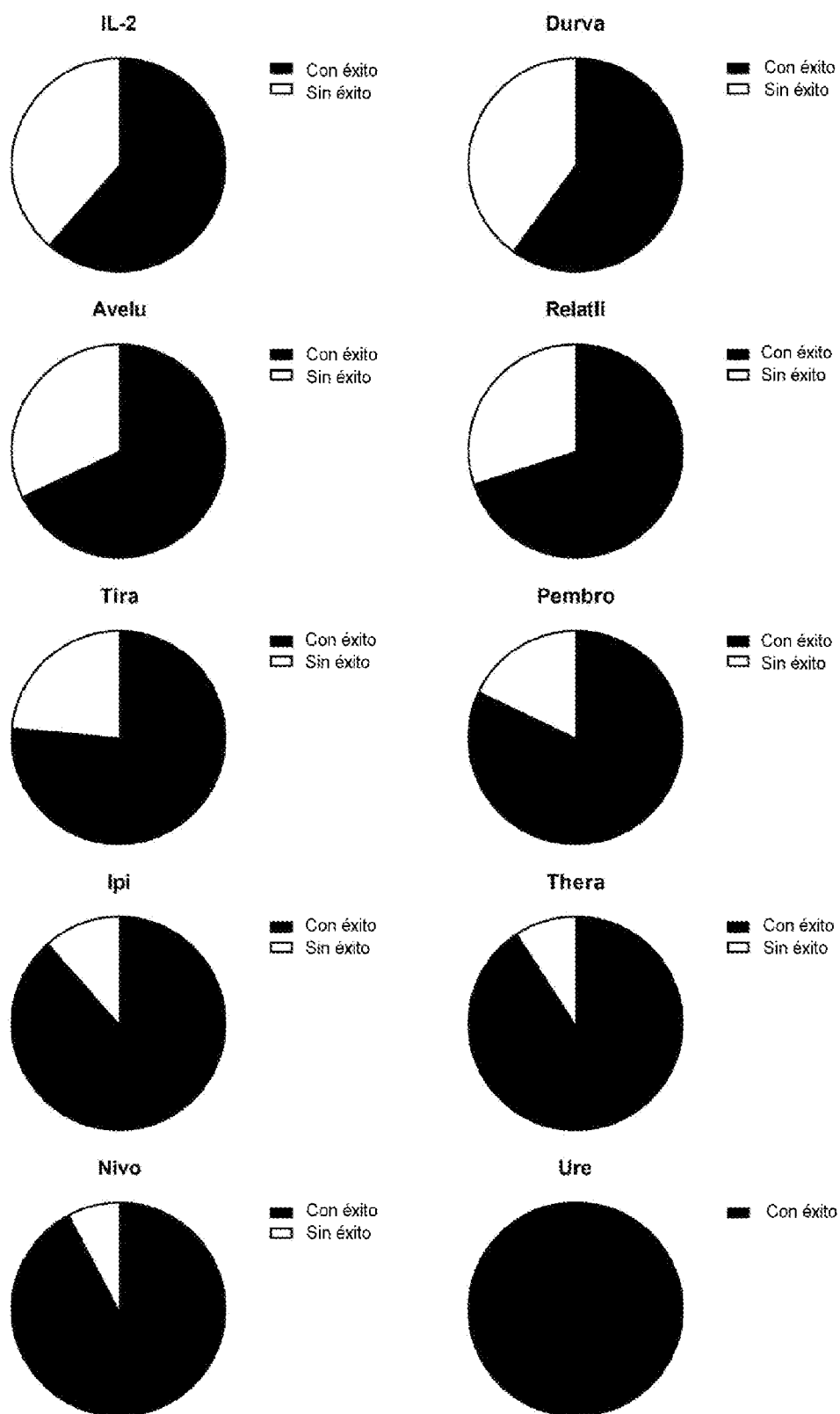


Fig 3

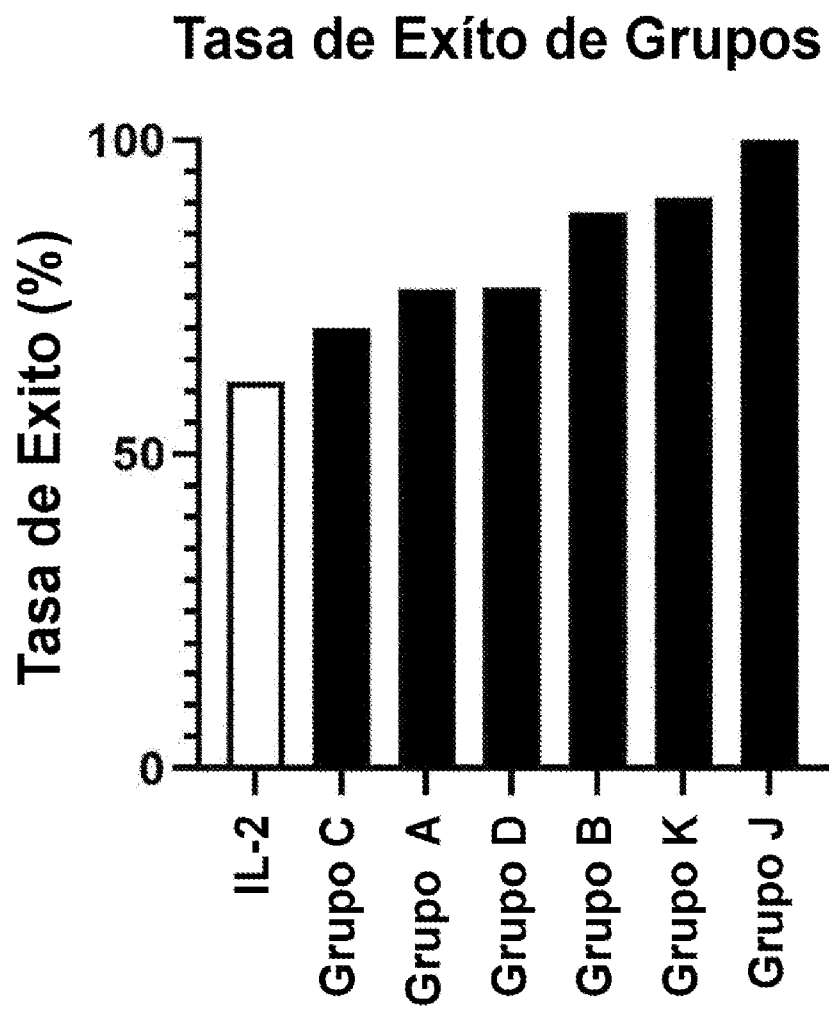


Fig 4

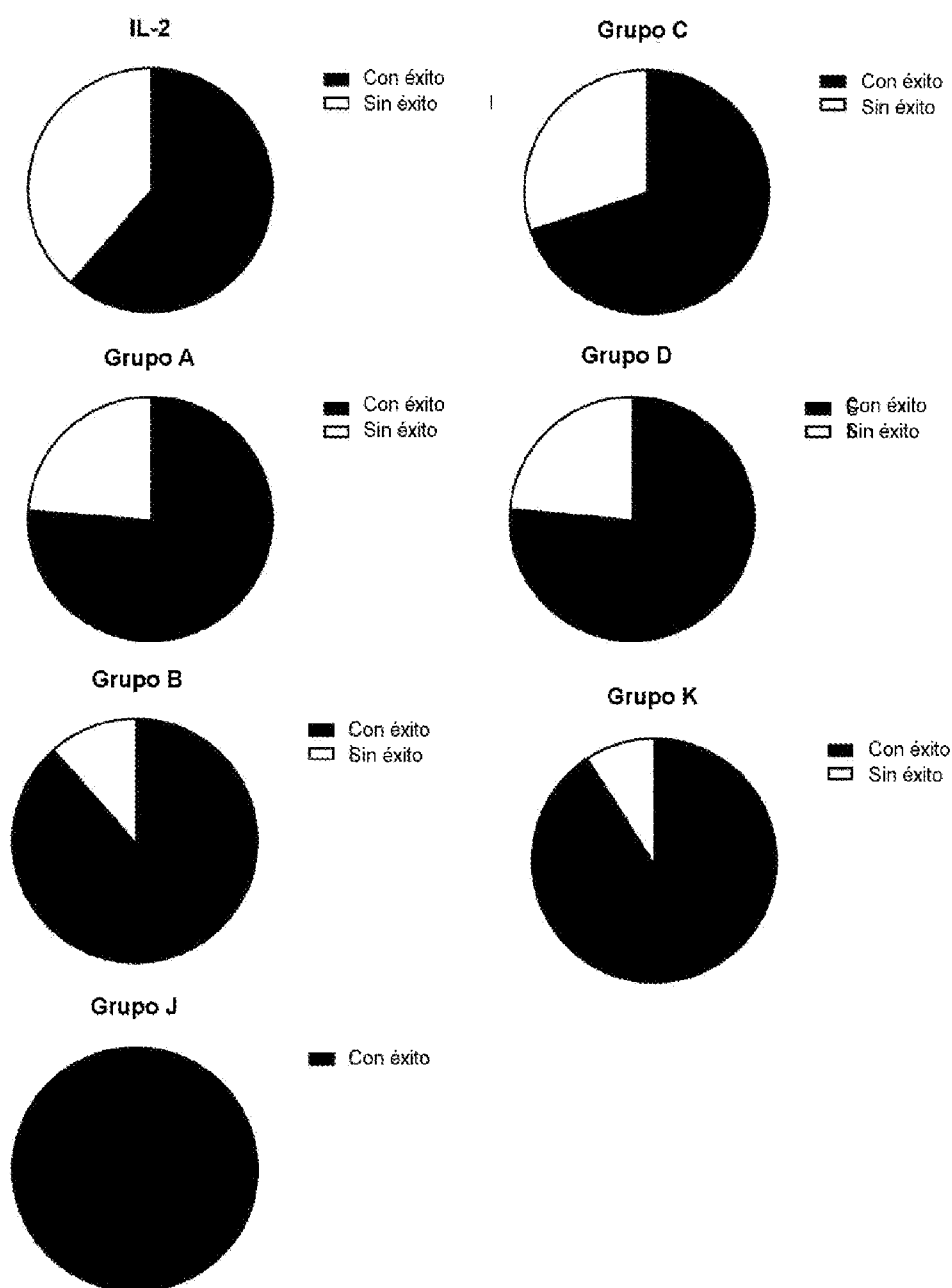


Fig 5

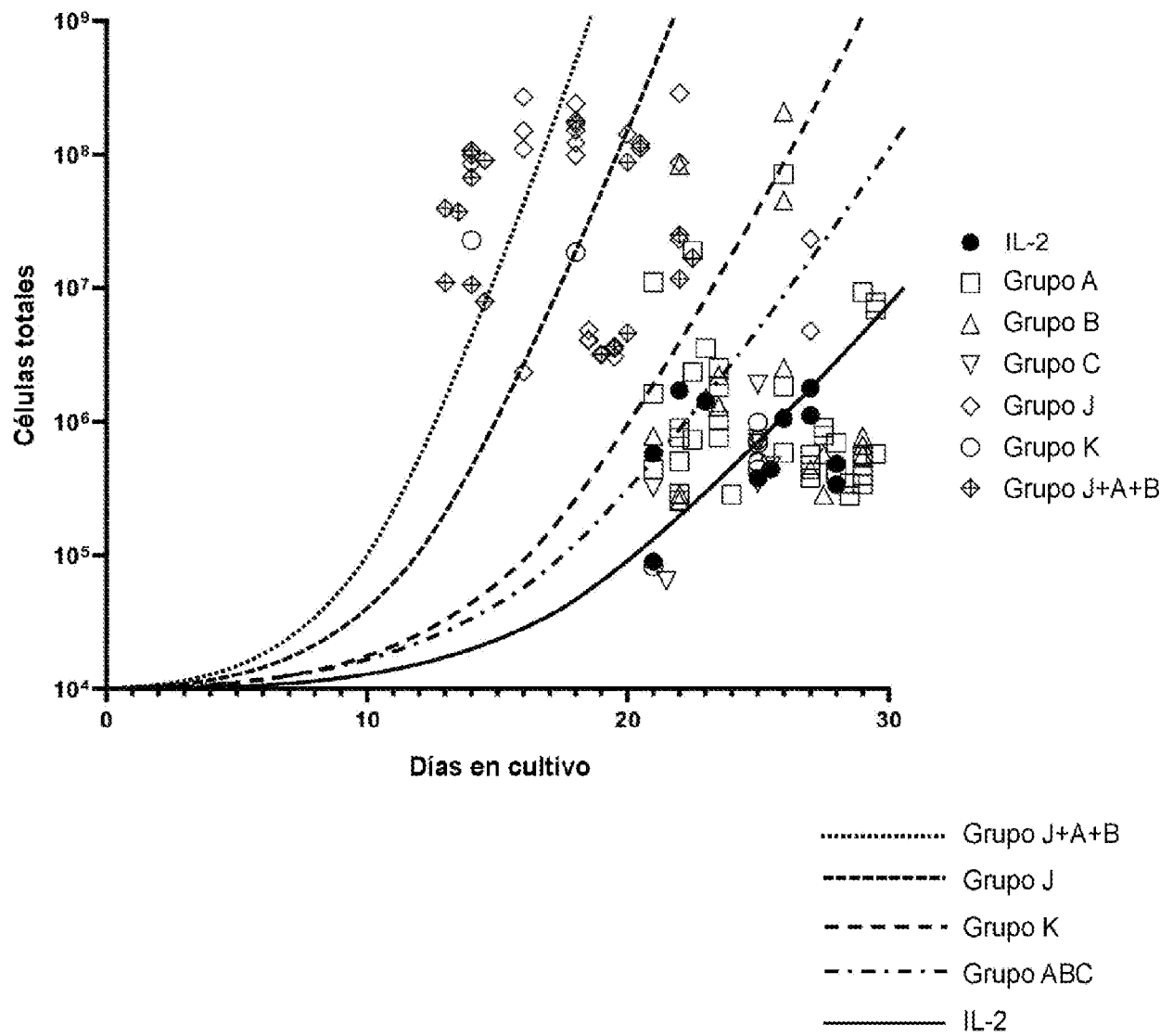


Fig 6

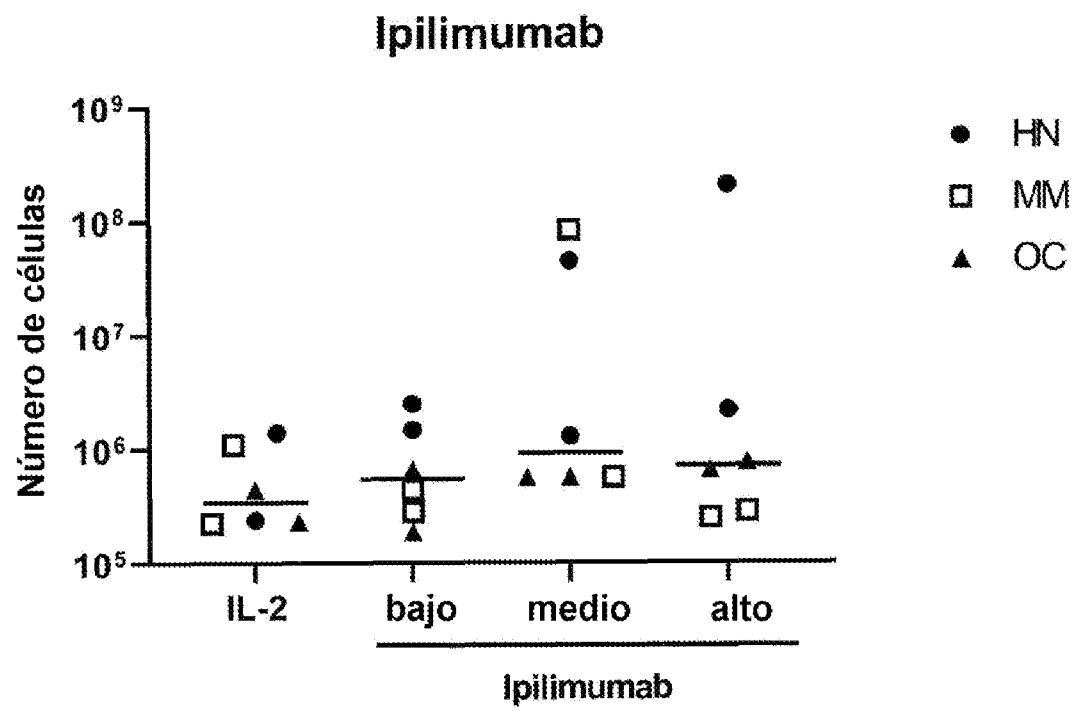


Fig 7

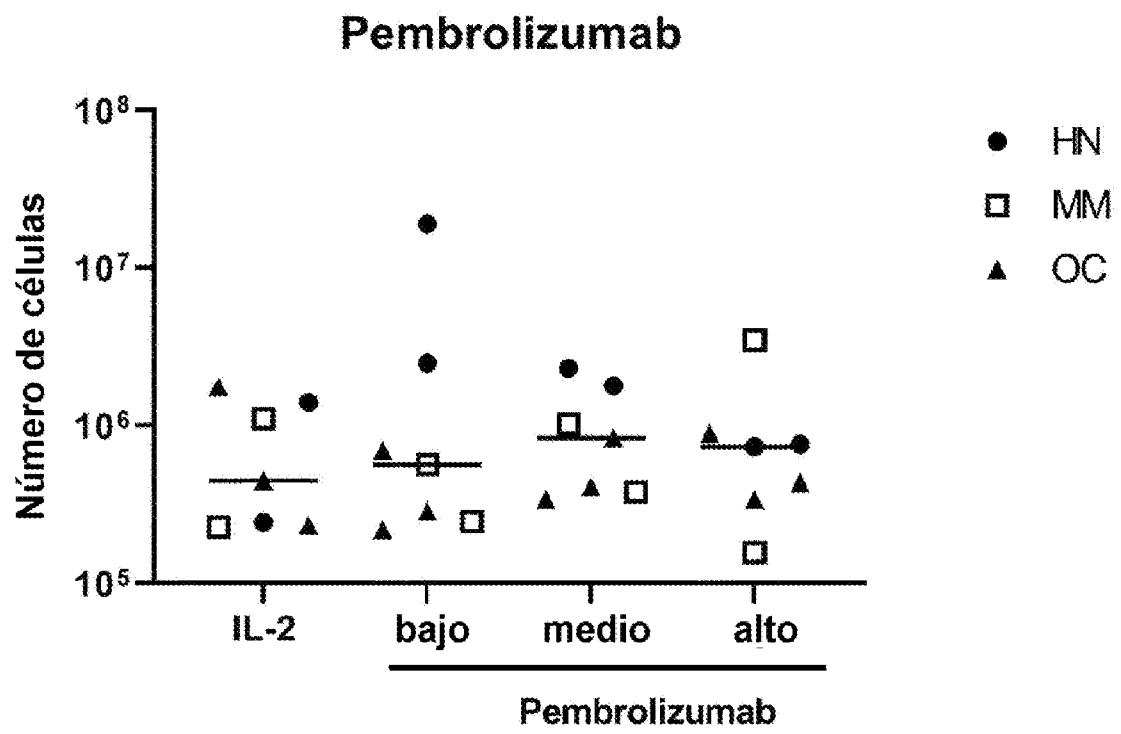


Fig 8

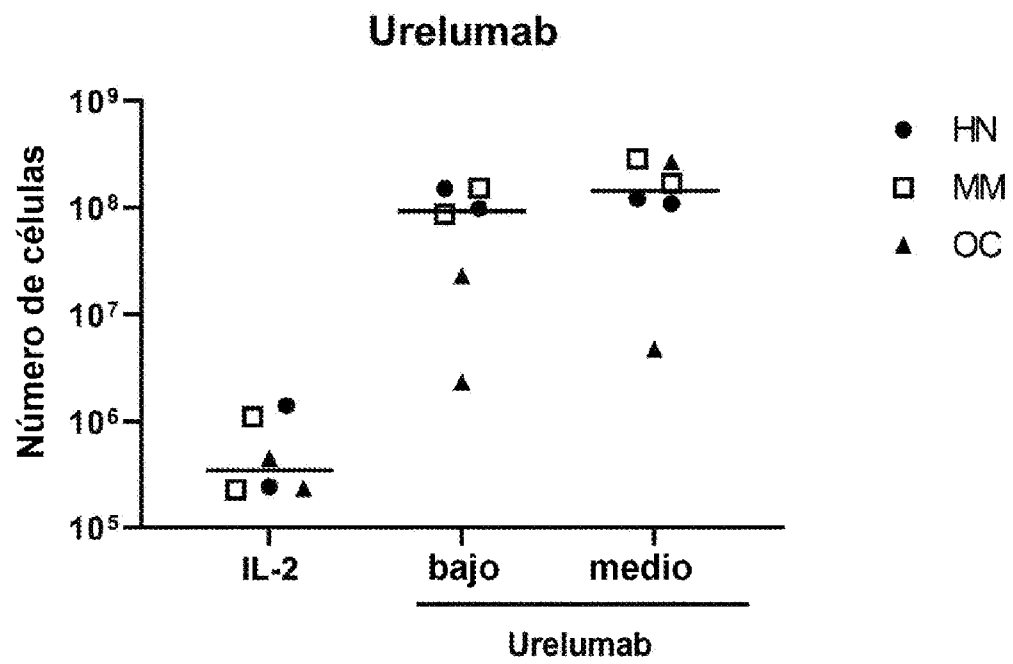


Fig 9

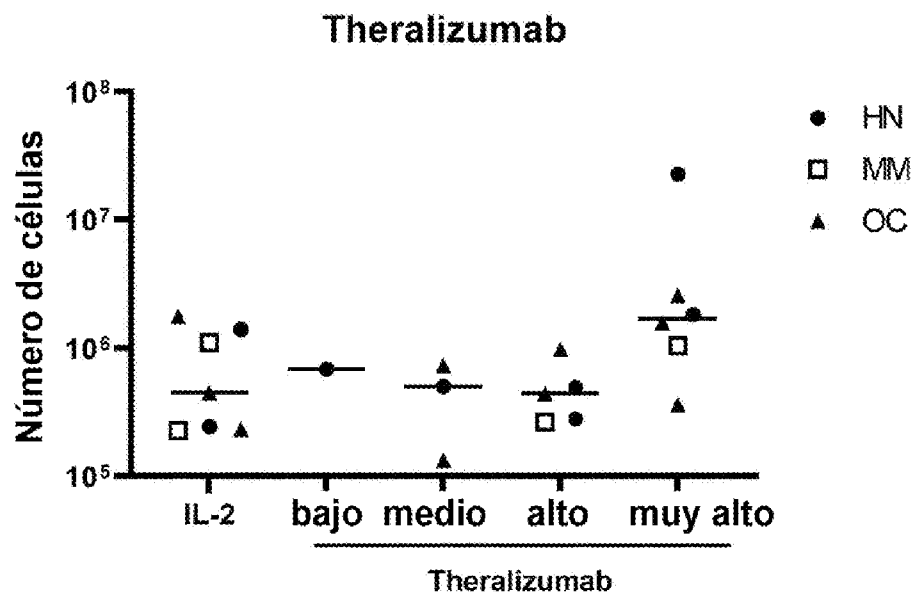


Fig 10

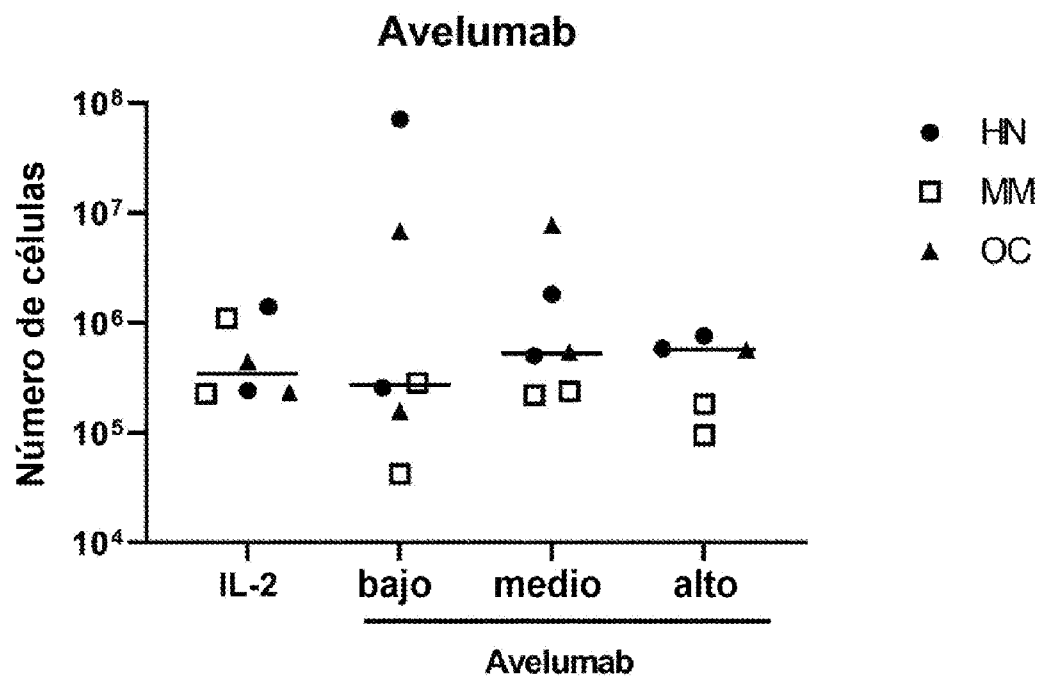


Fig 11

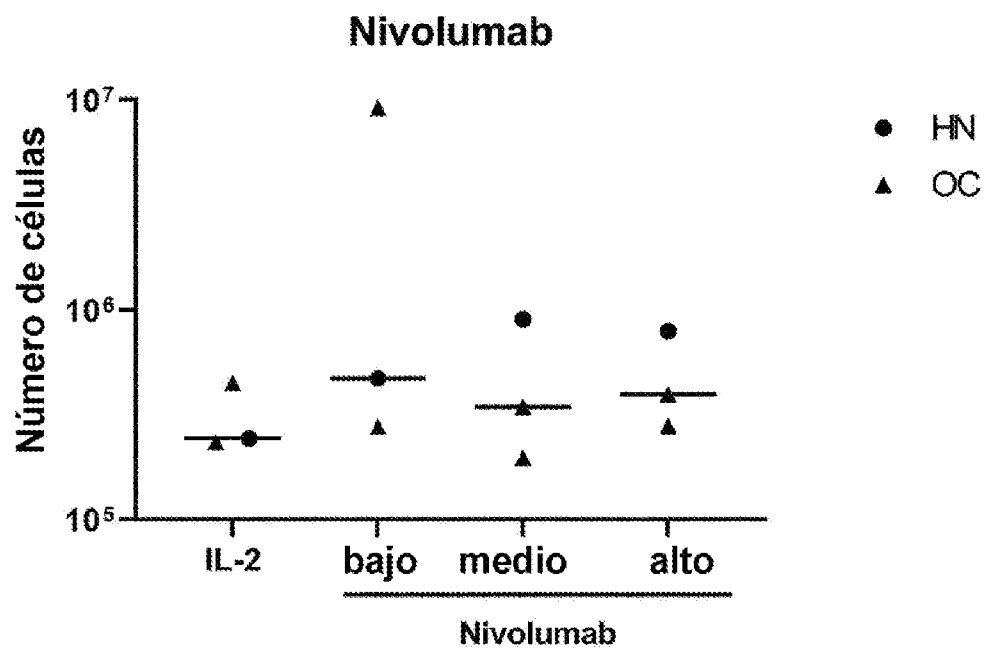


Fig 12

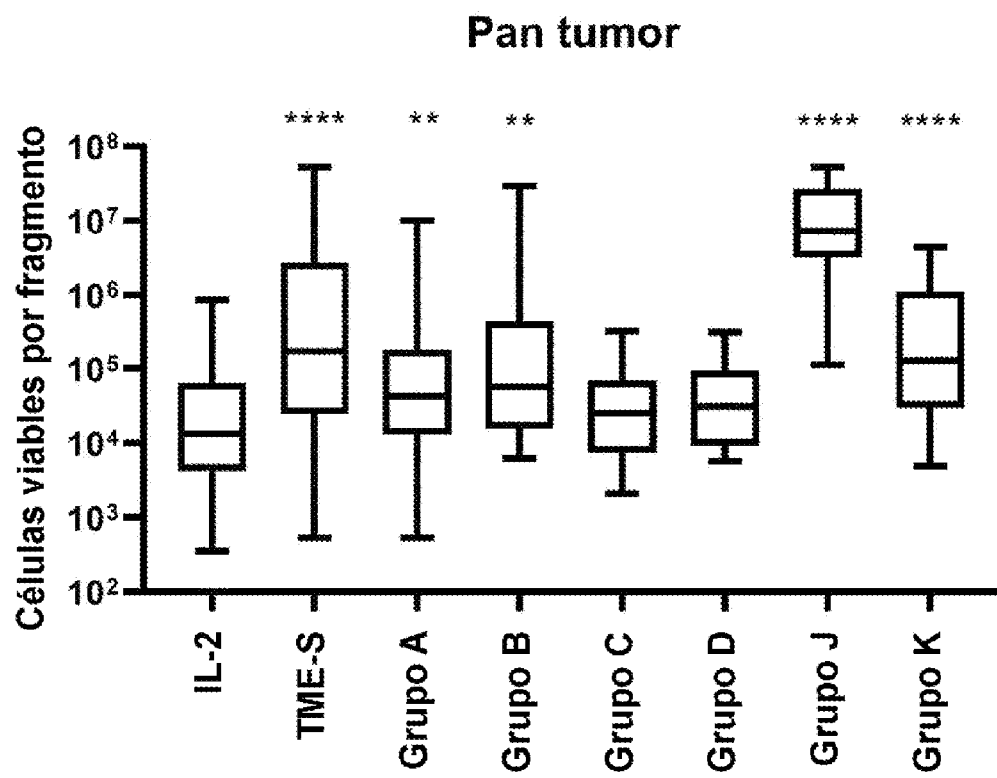


Fig 13

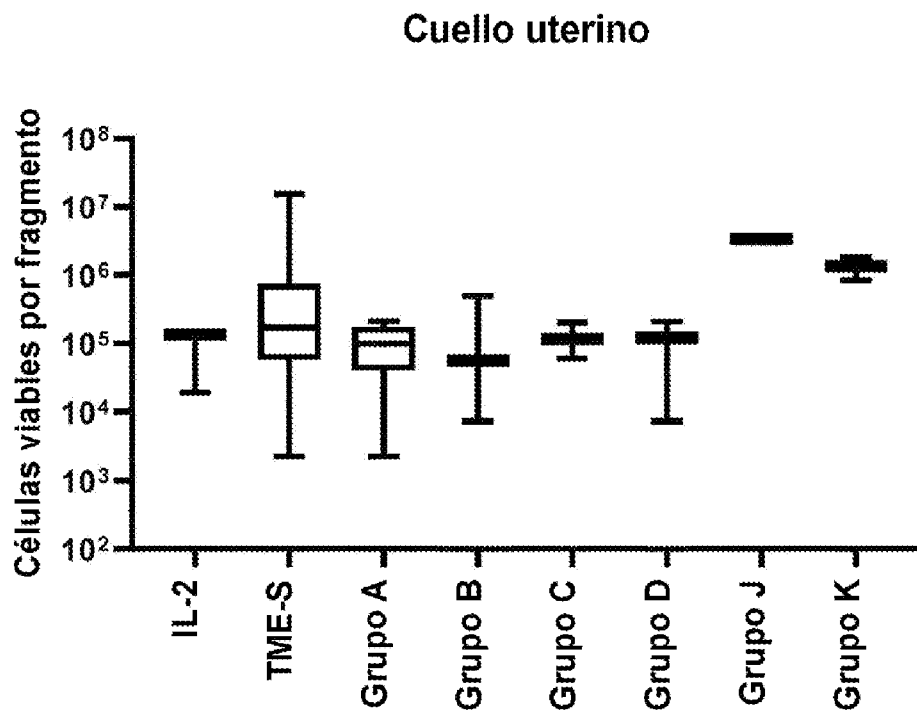


Fig 14

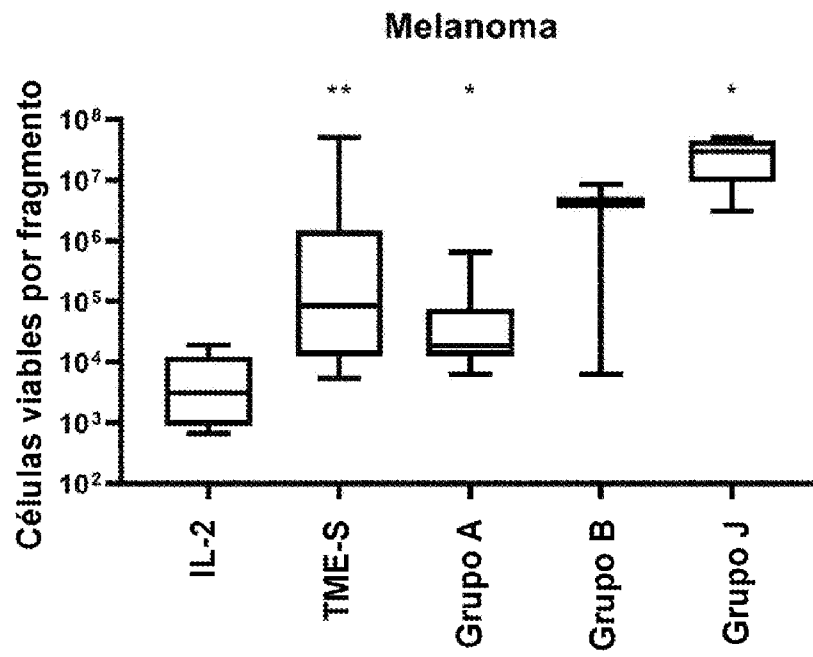


Fig 15

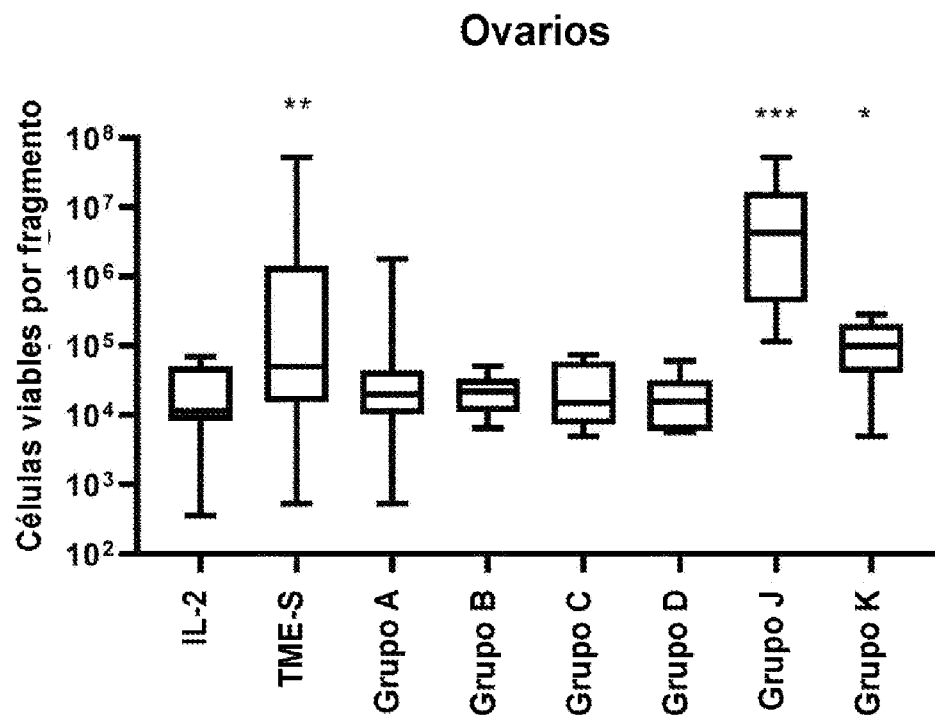


Fig 16

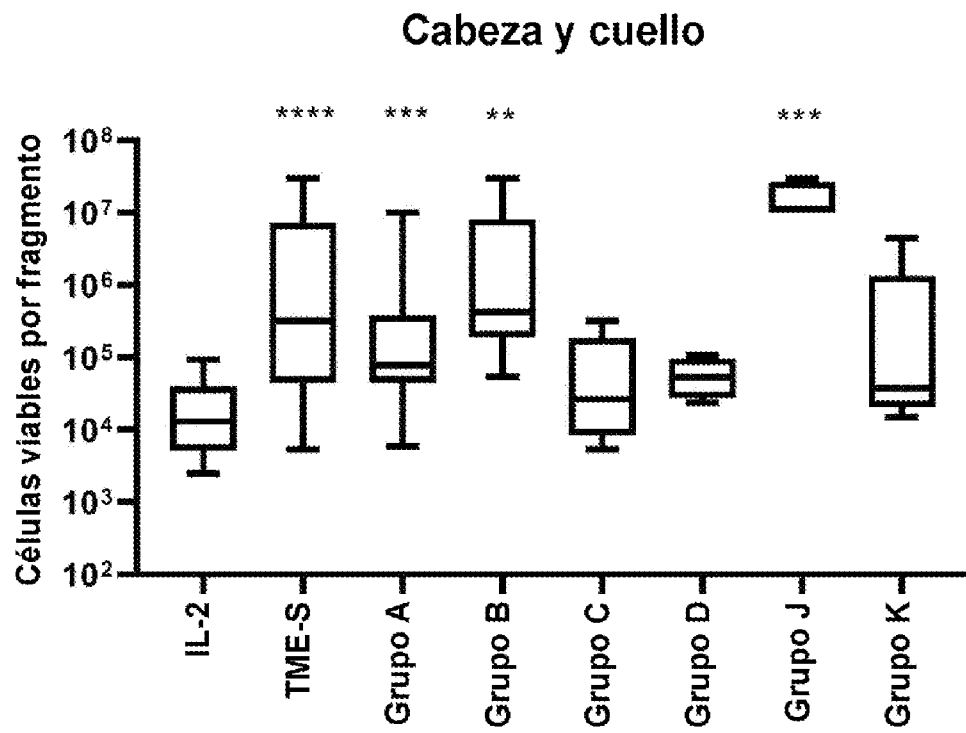


Fig 17

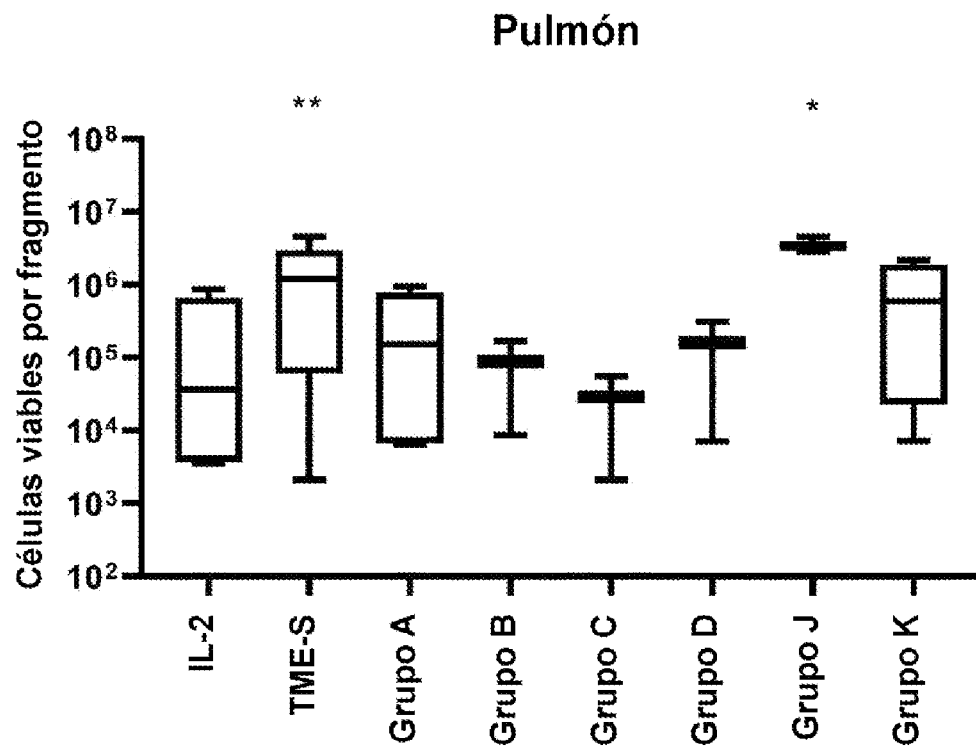


Fig 18

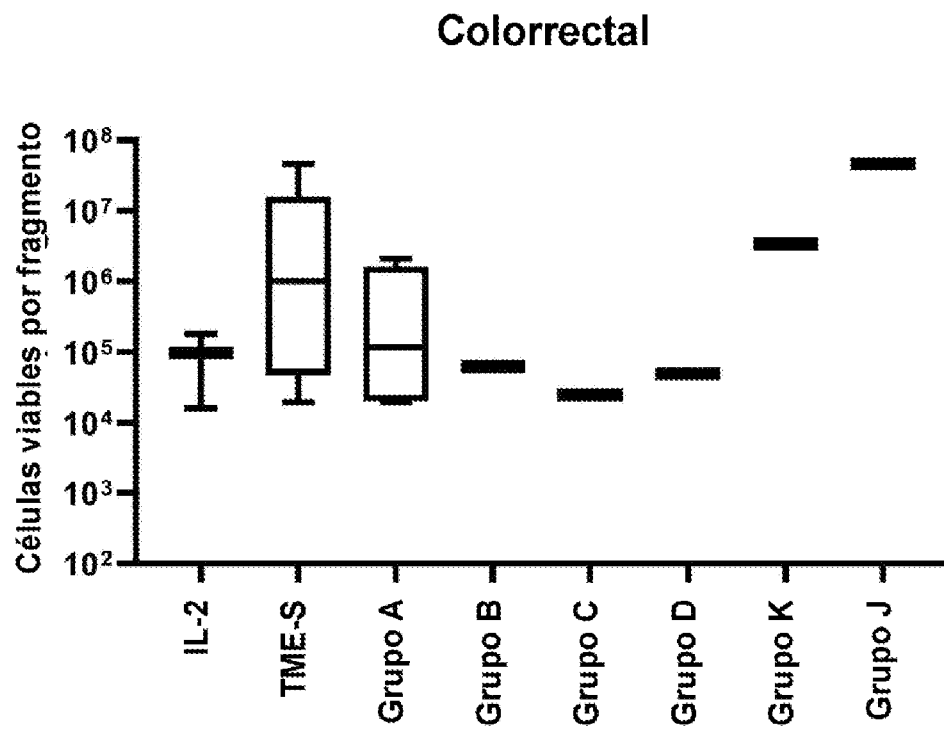


Fig 19

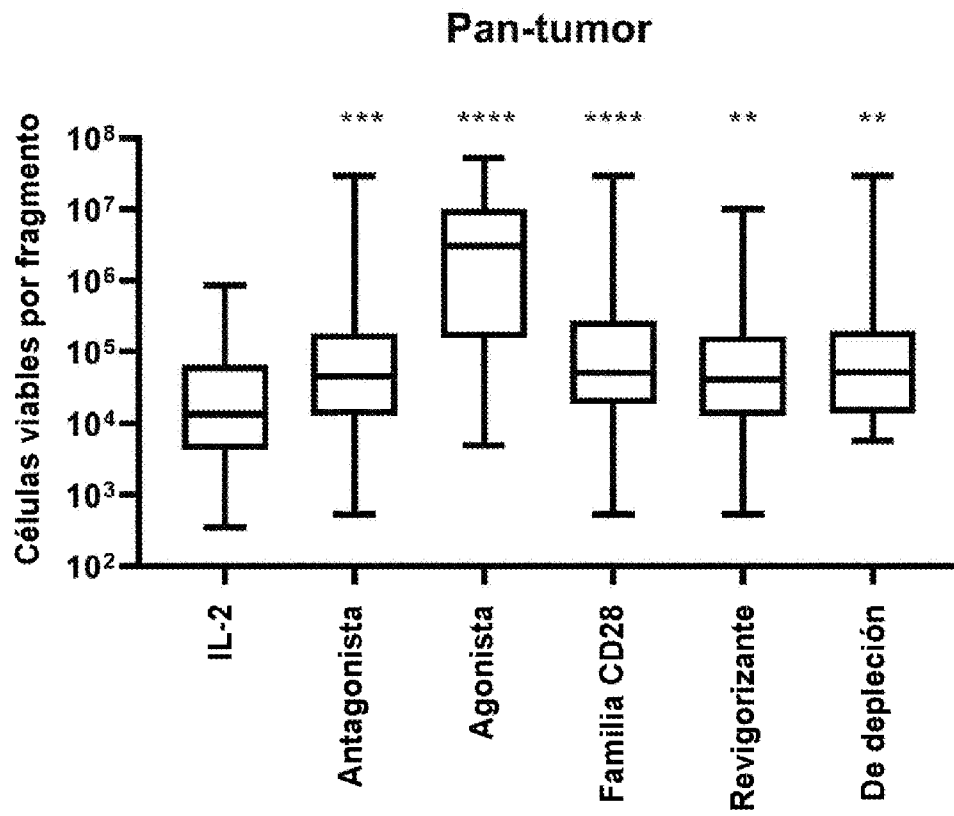


Fig 20

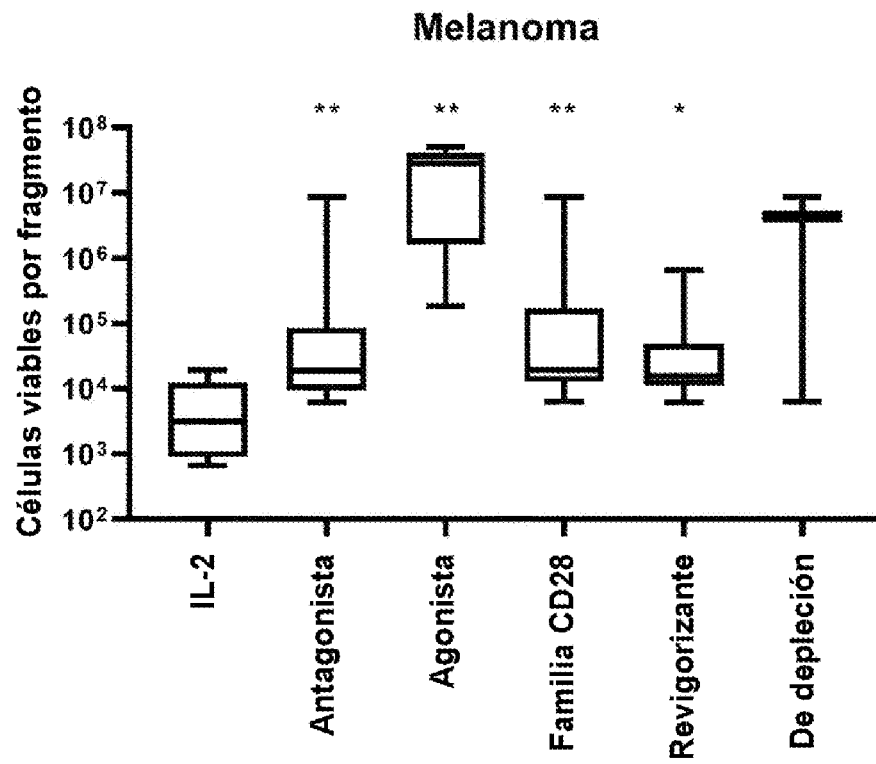


Fig 21

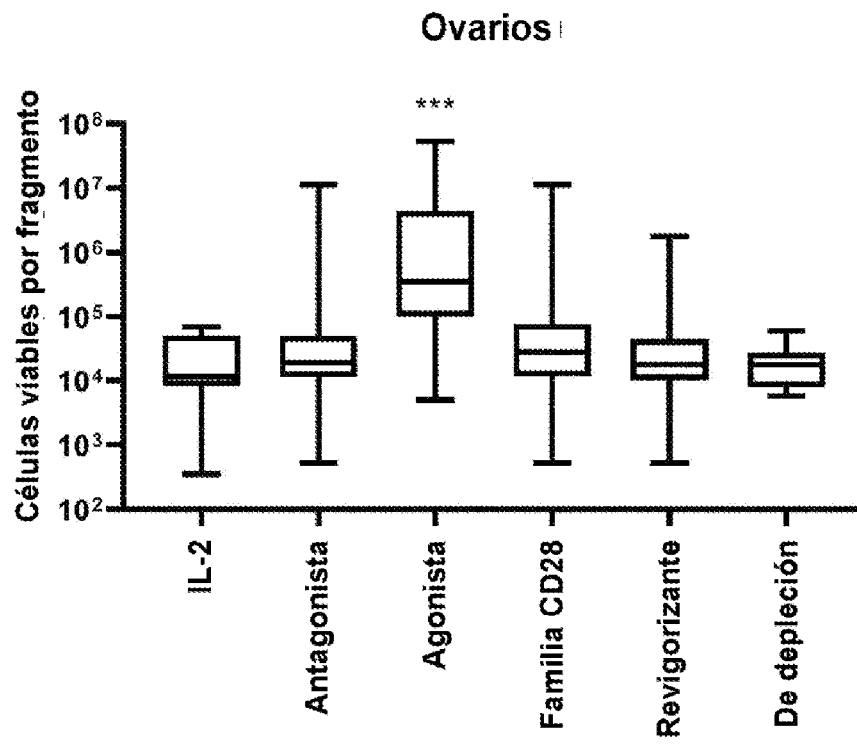


Fig 22

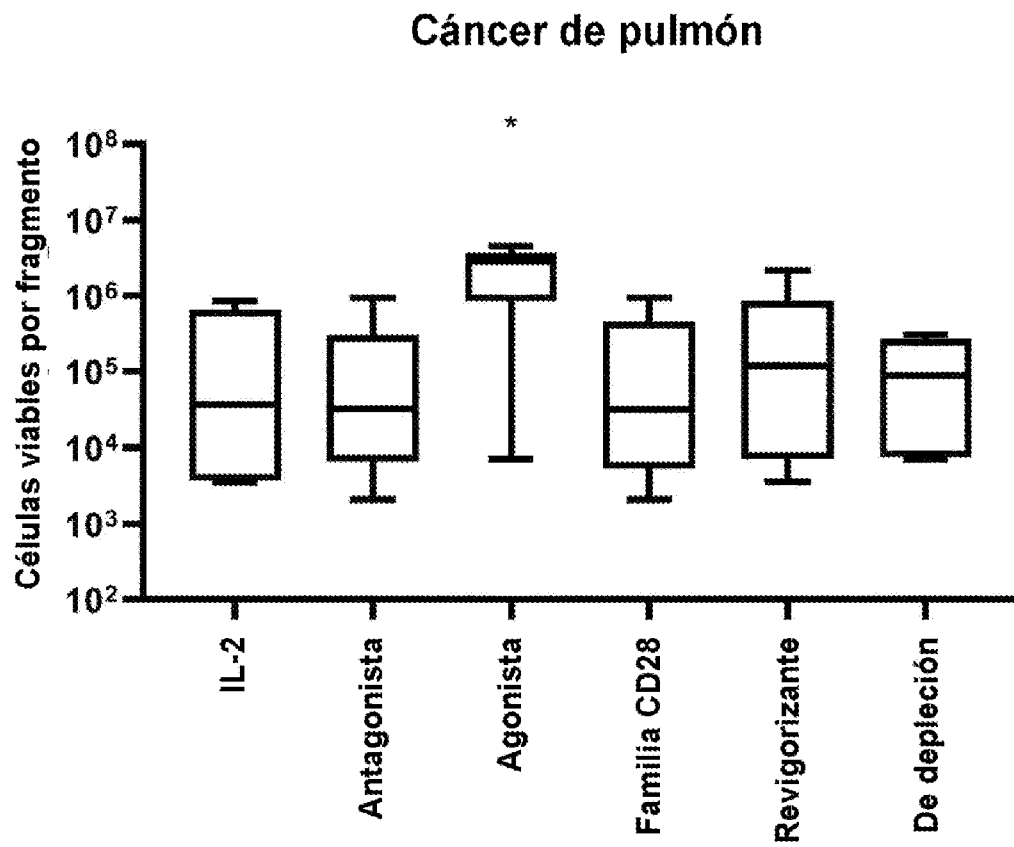


Fig 23

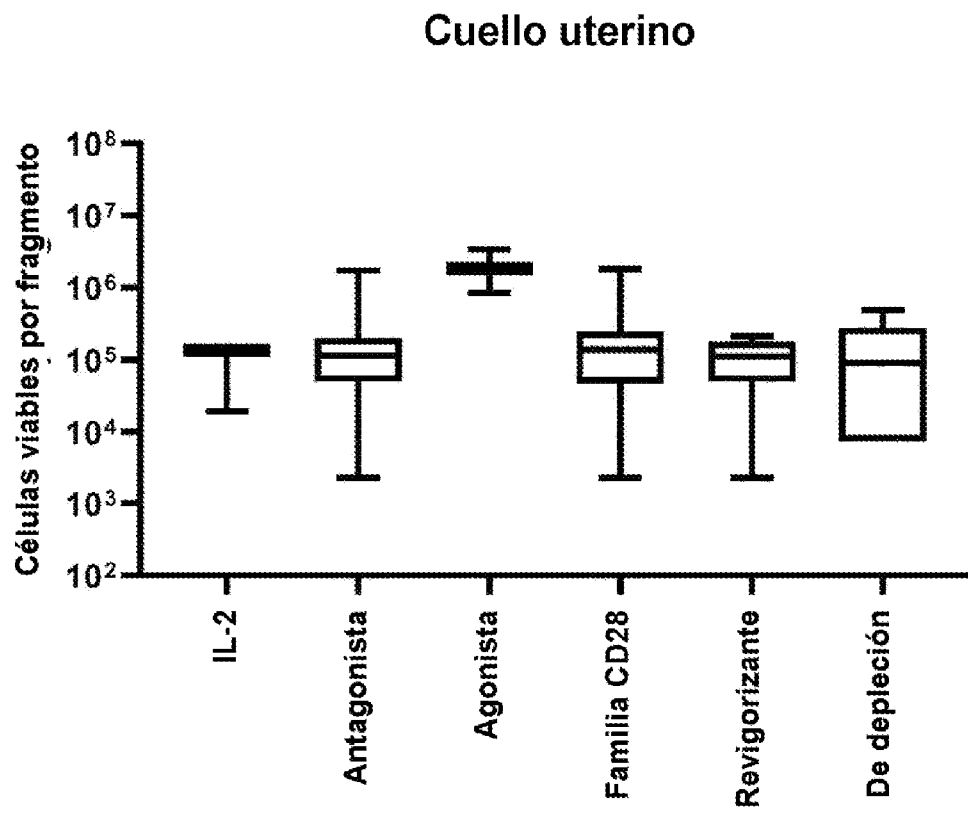


Fig 24

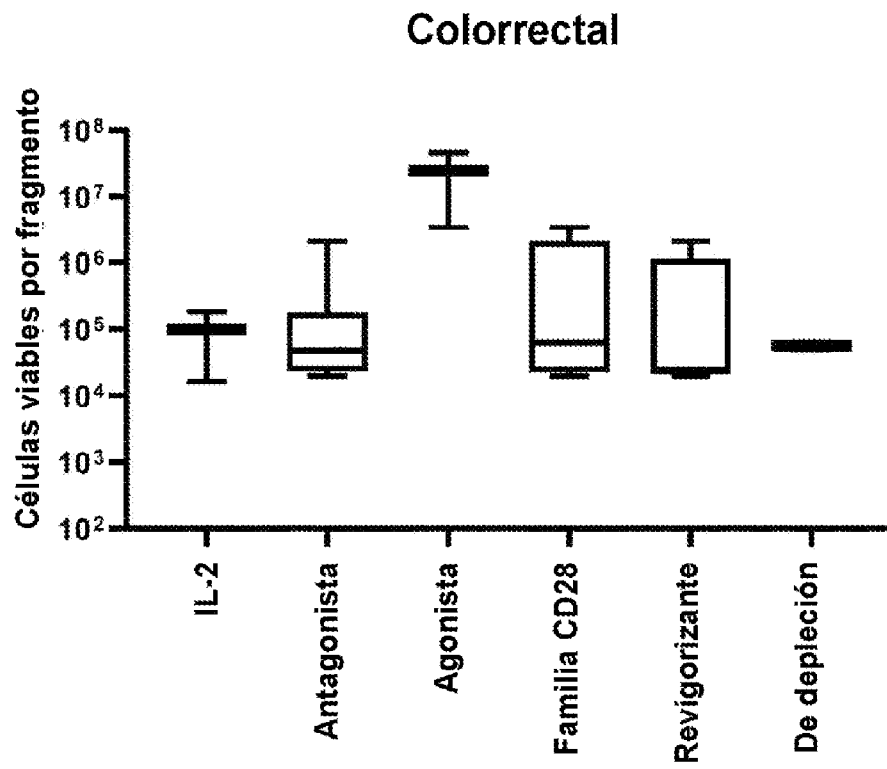


Fig 25

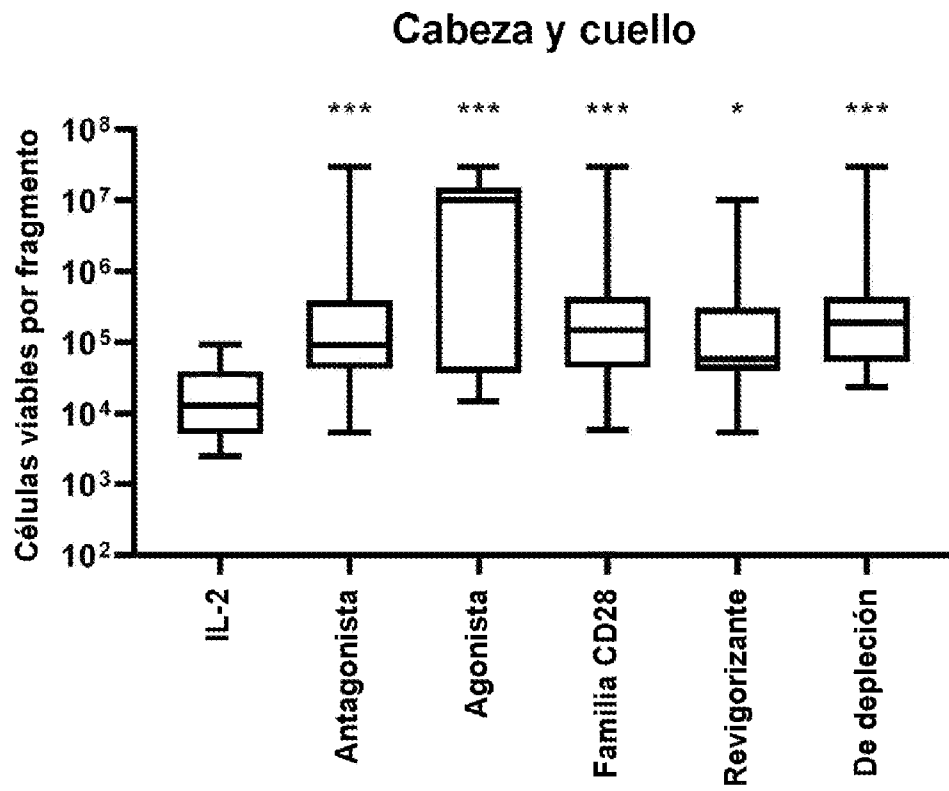


Fig 26

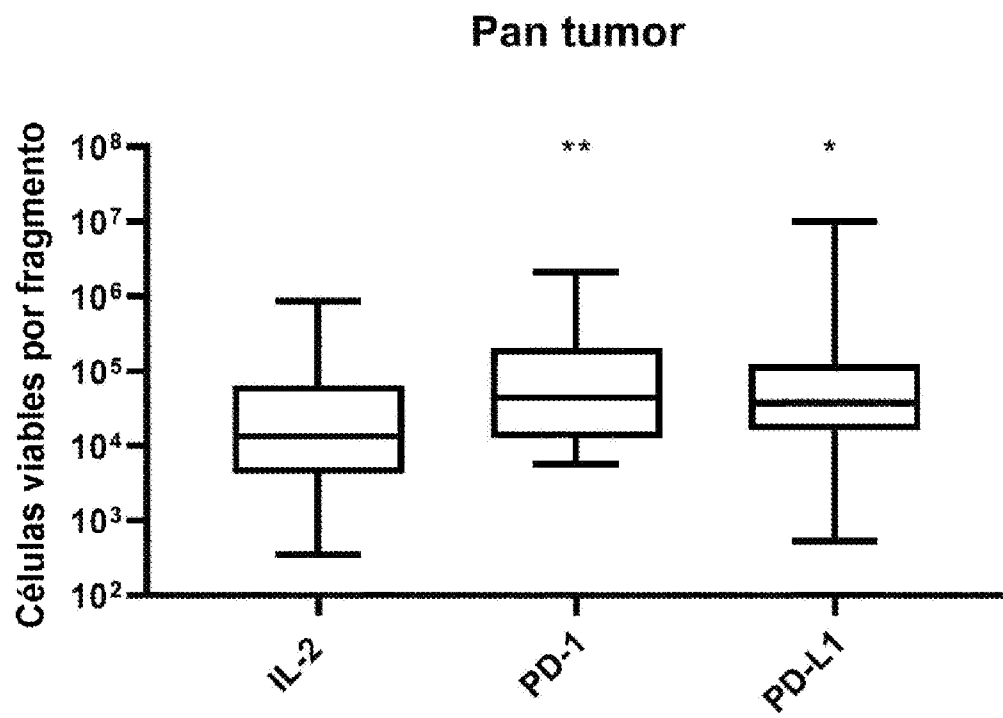


Fig 27

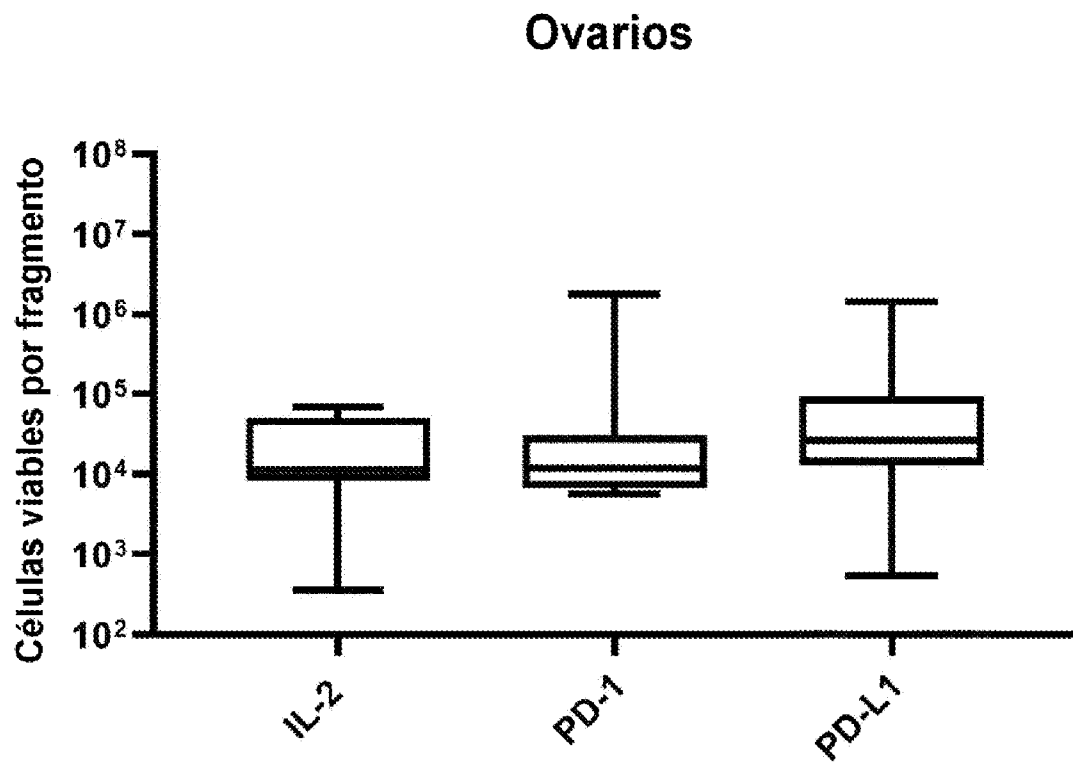


Fig 28

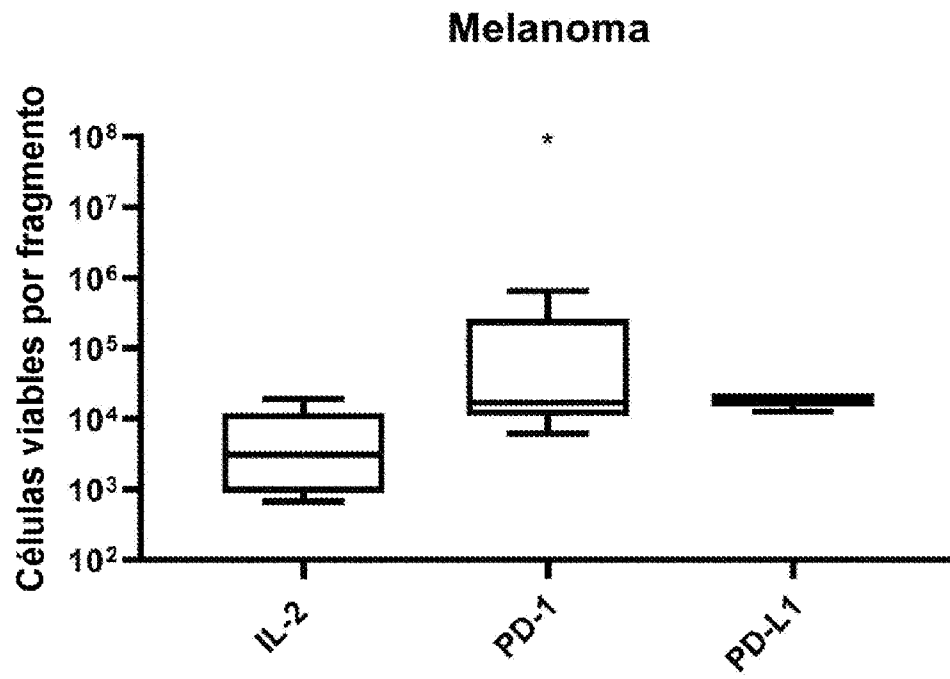


Fig 29

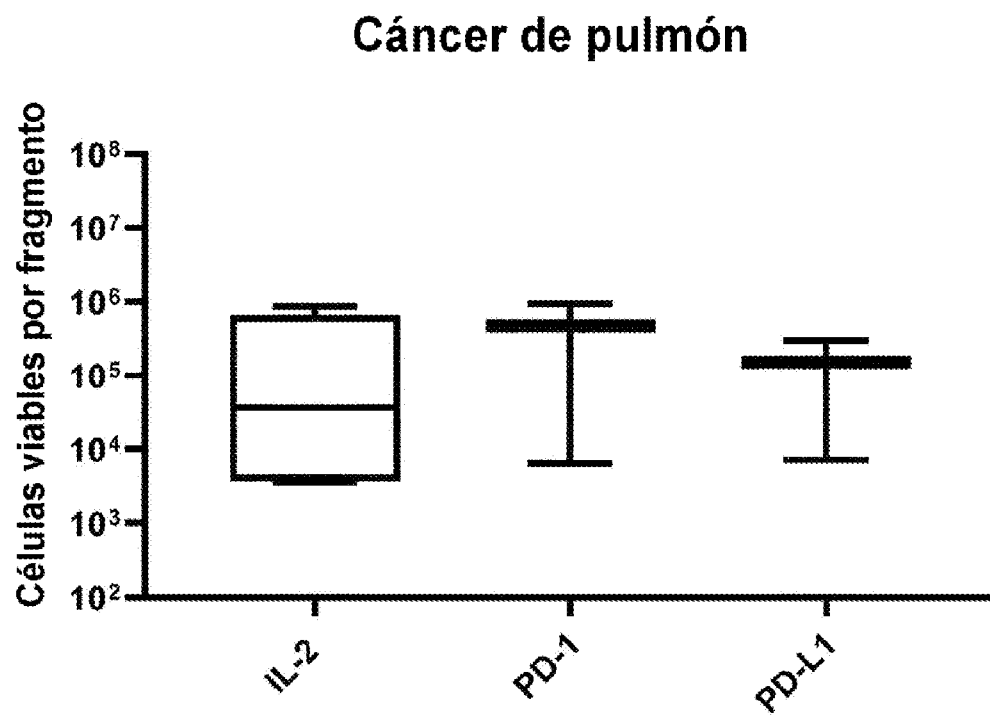


Fig 30

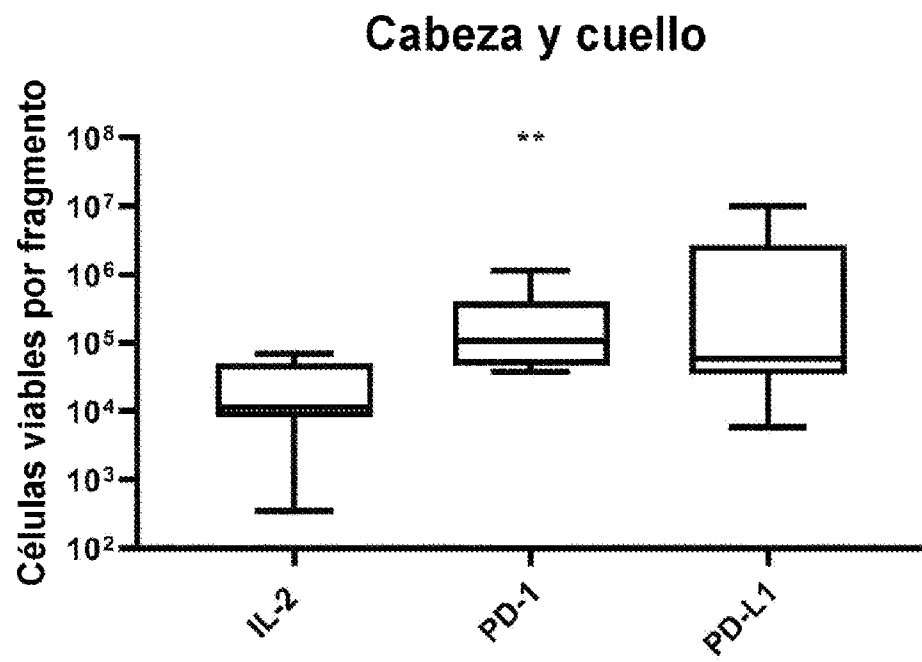


Fig 31

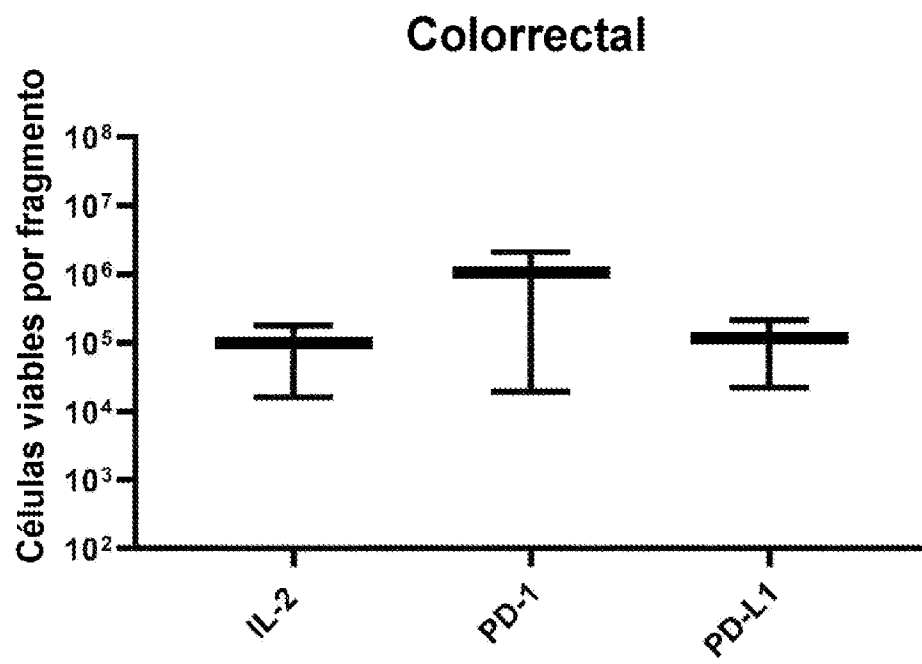


Fig 32

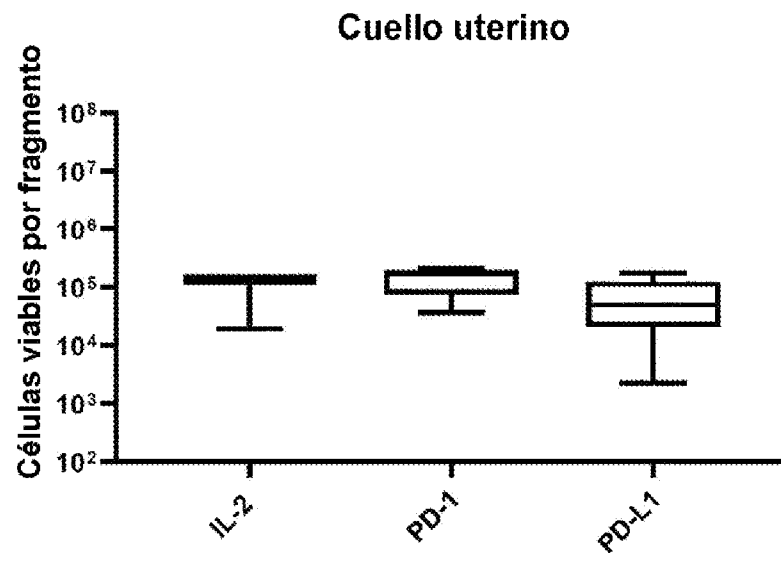


Fig 33

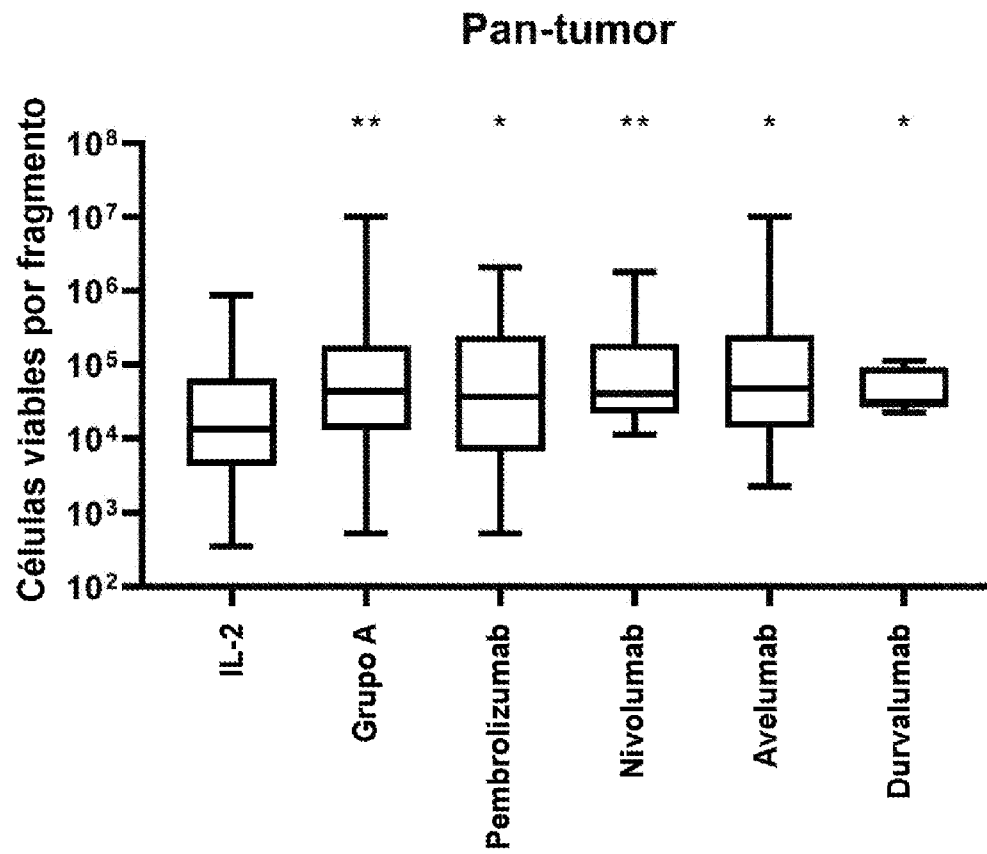


Fig 34

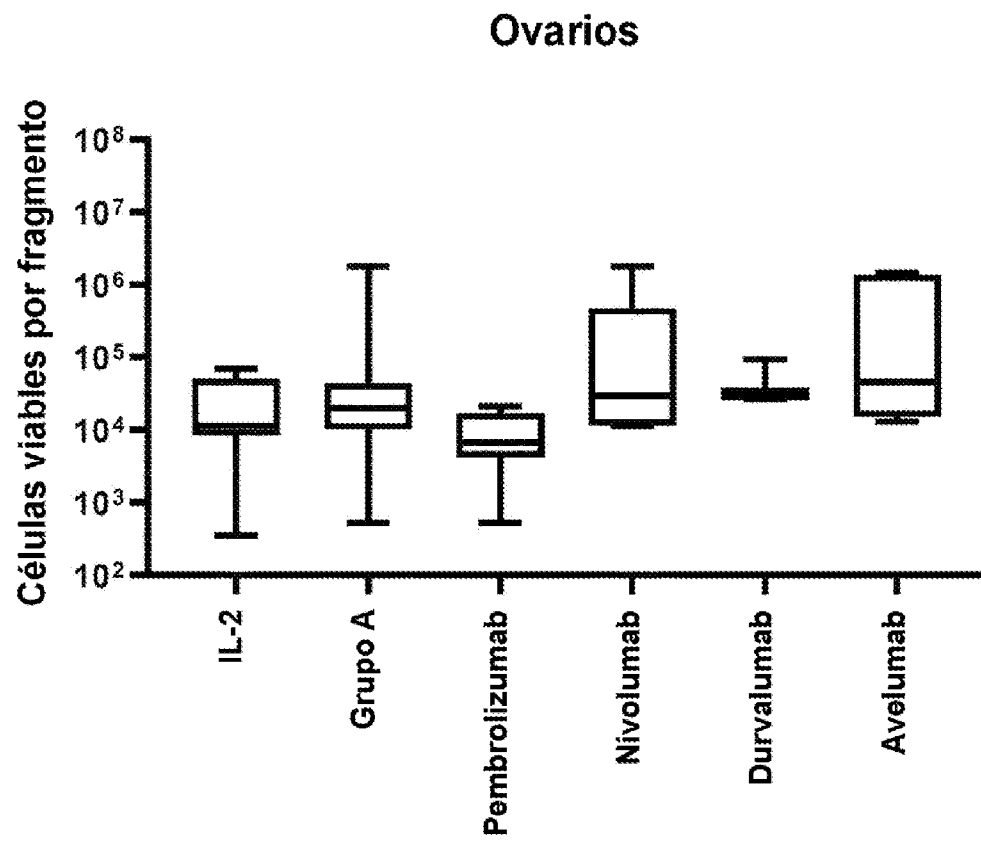


Fig 35

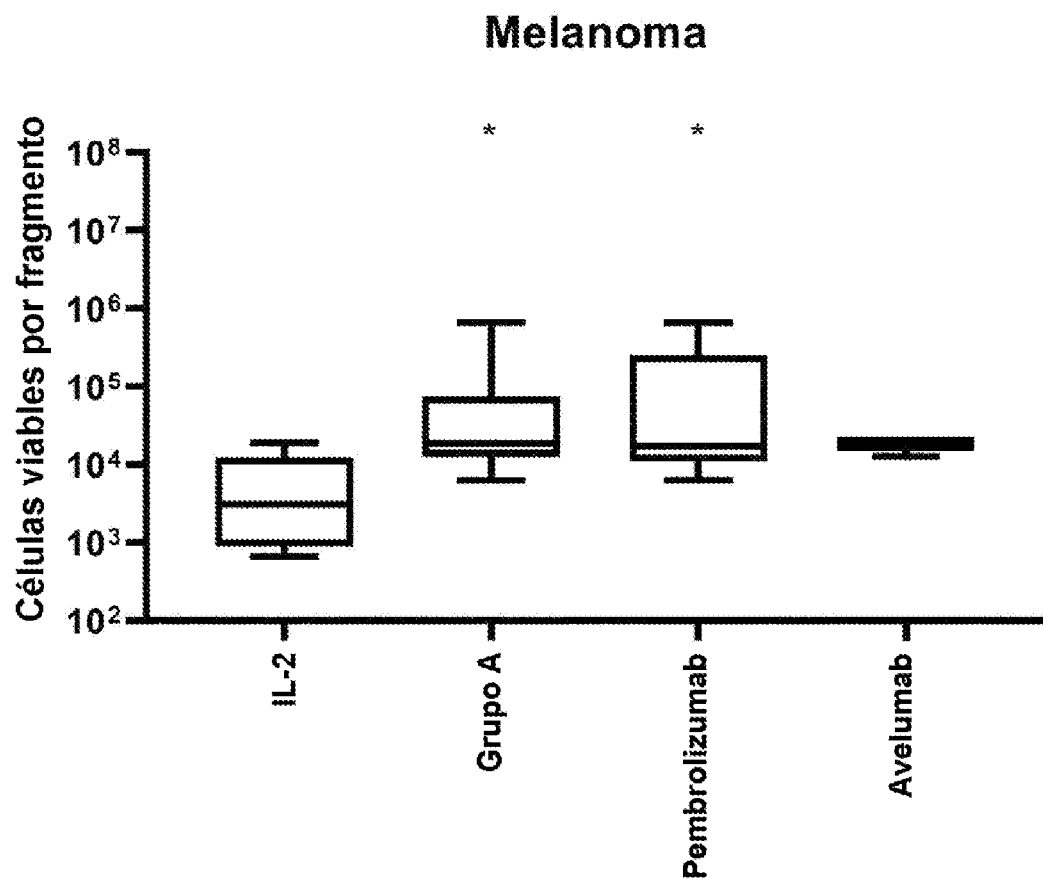


Fig 36

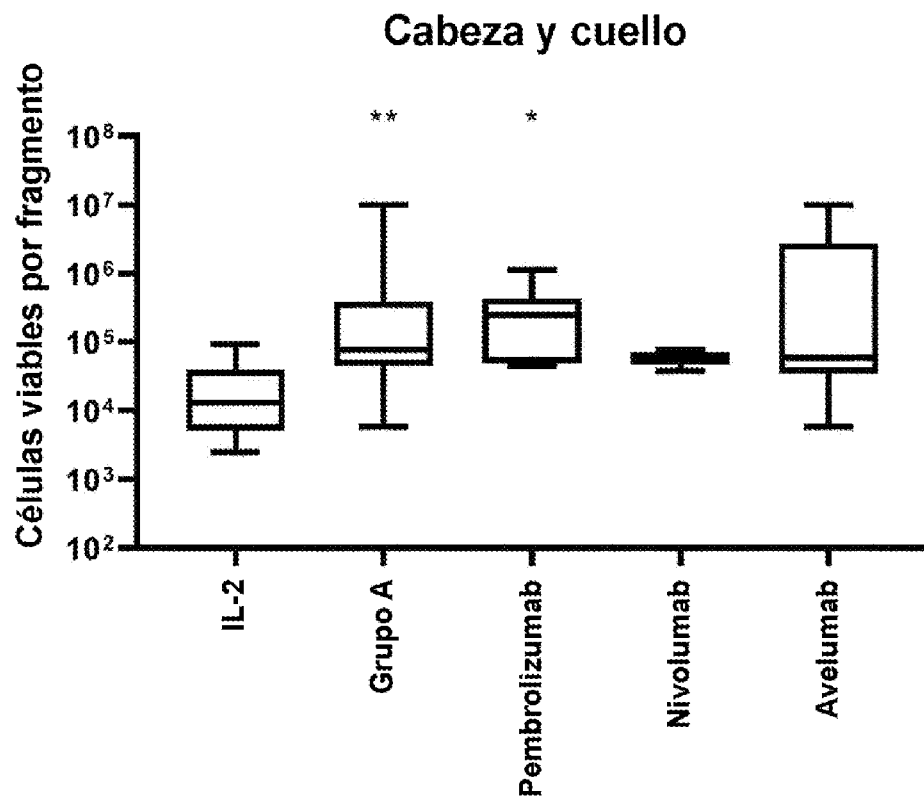


Fig 37

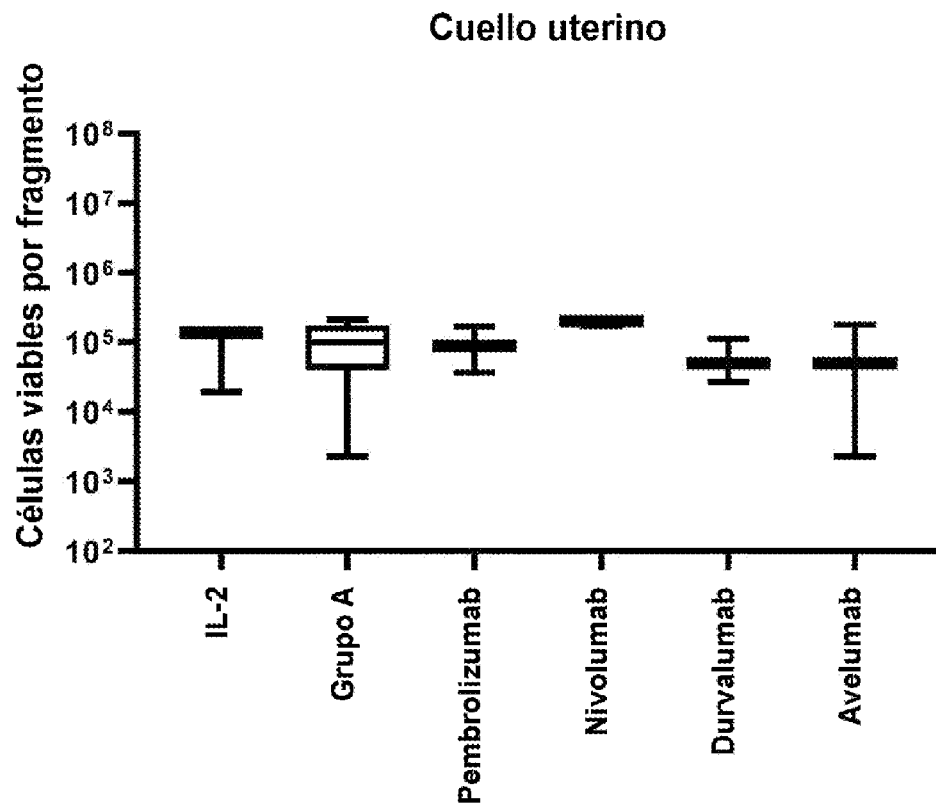


Fig 38

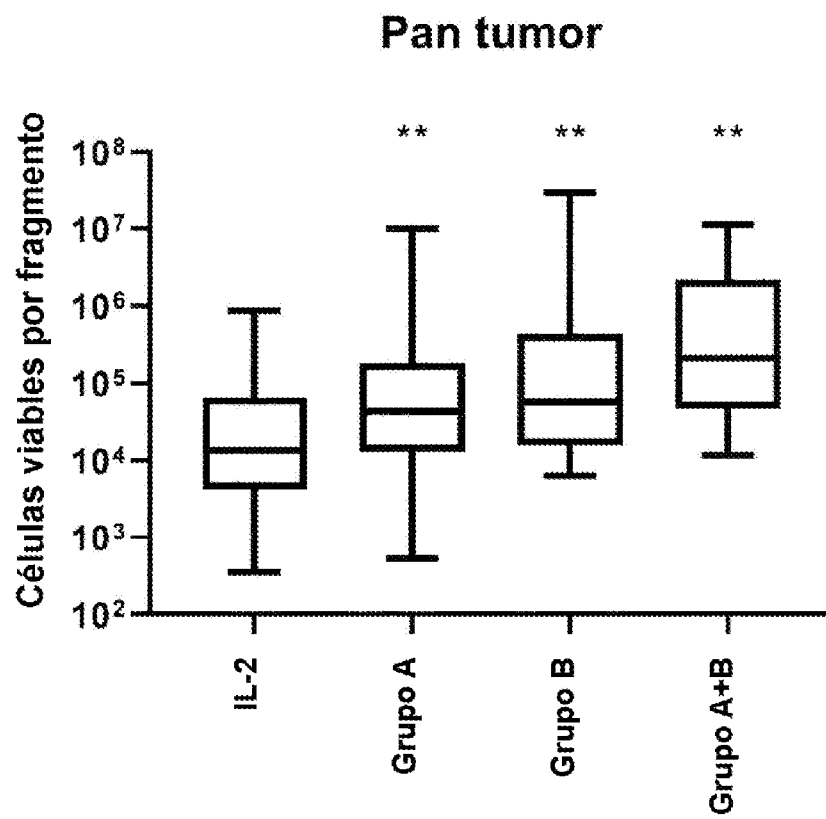


Fig 39

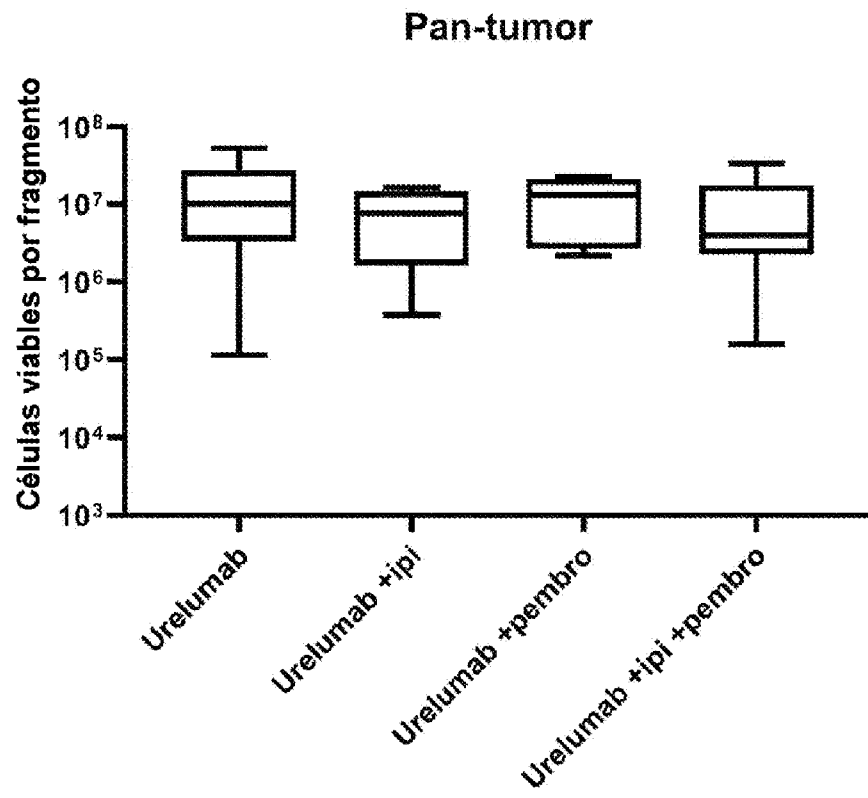


Fig 40

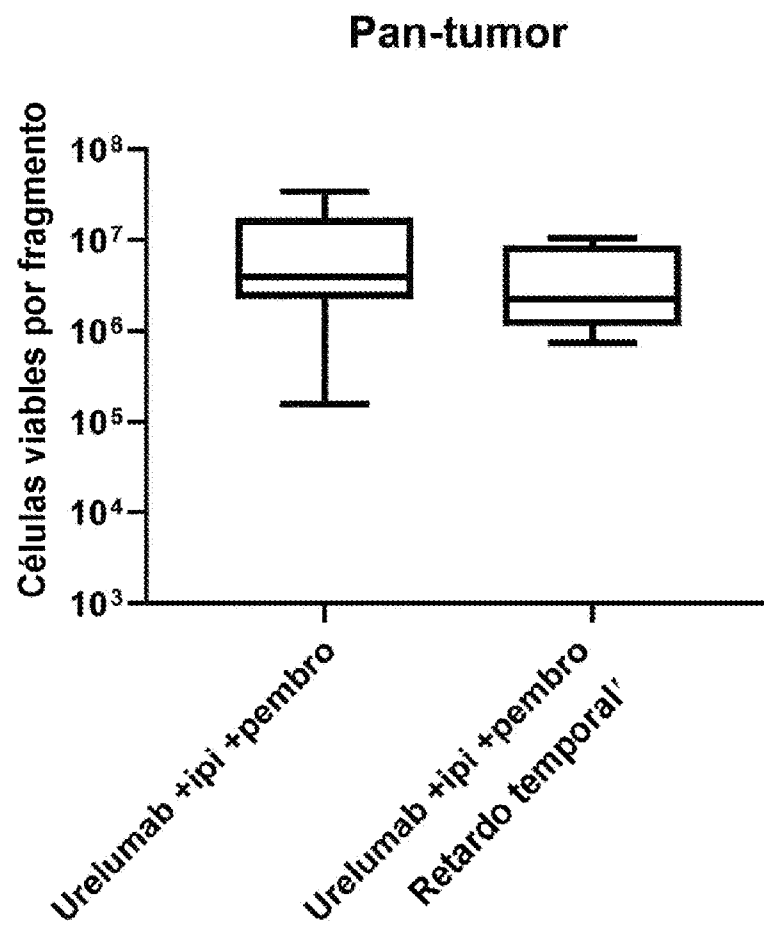


Fig 41

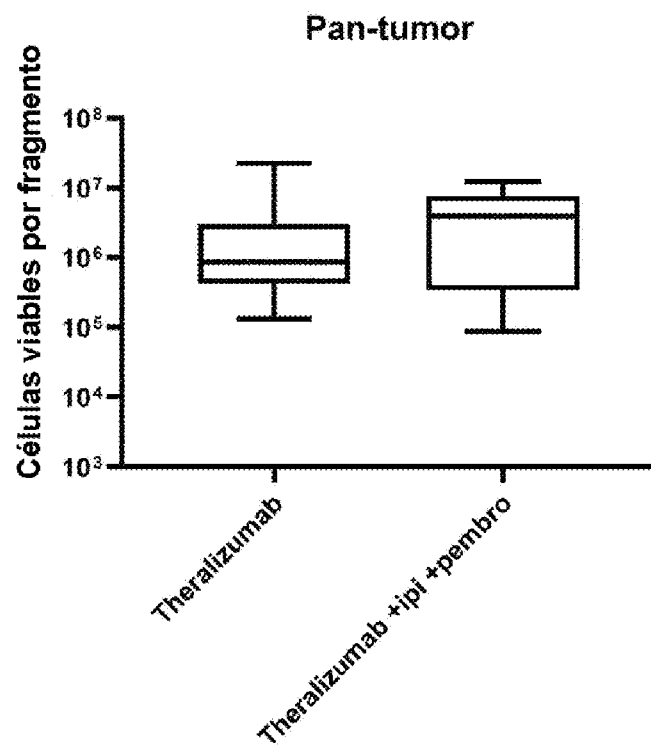


Fig 42

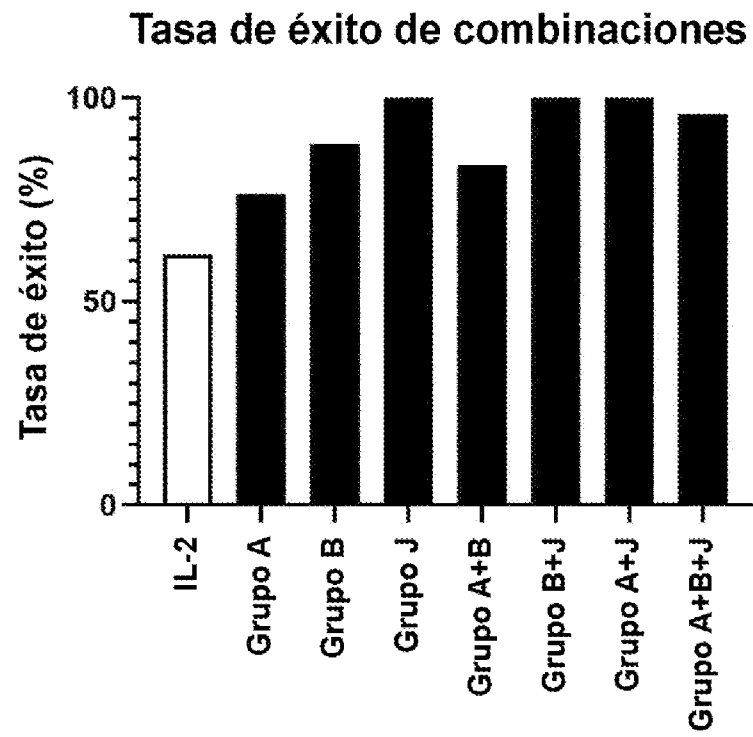


Fig 43

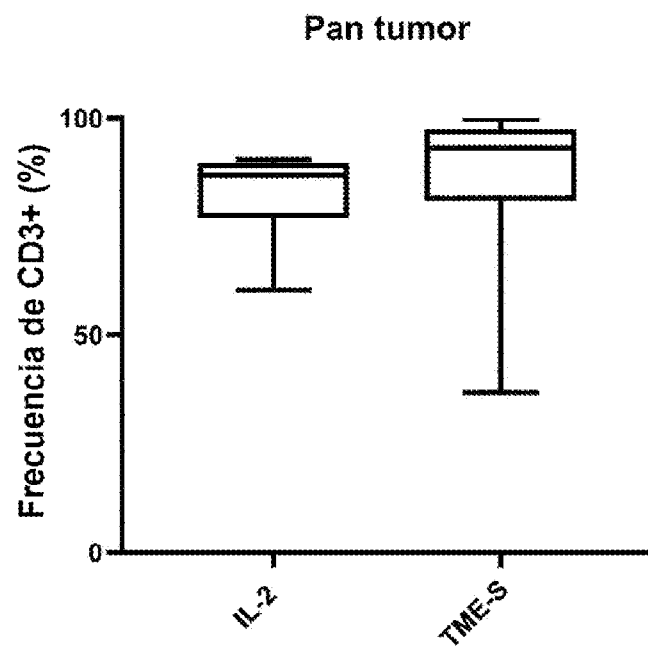


Fig 44

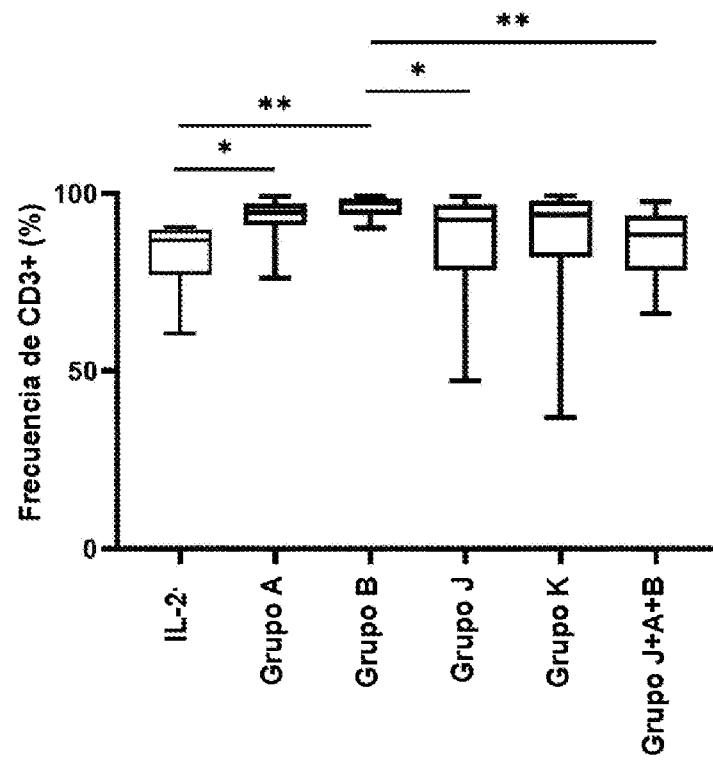


Fig 45

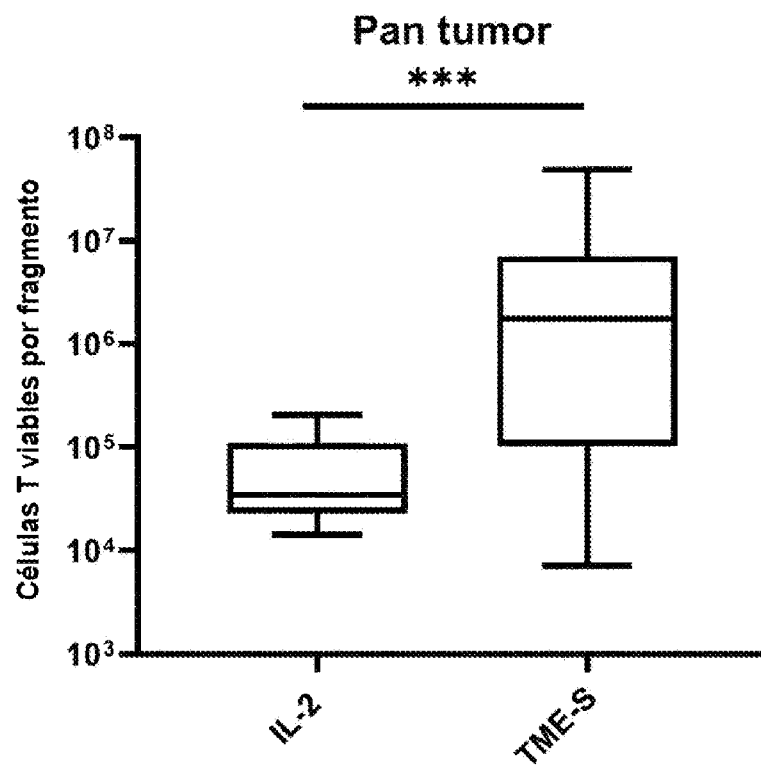


Fig 46

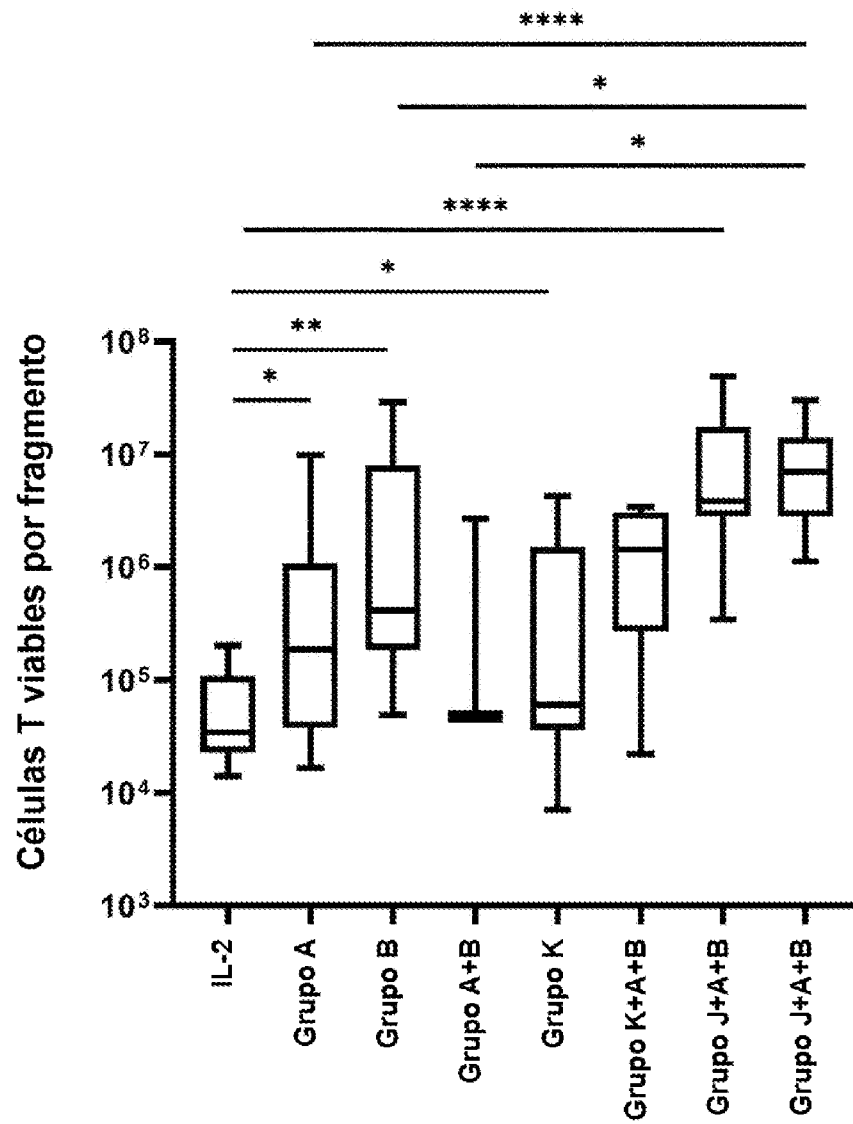


Fig 47

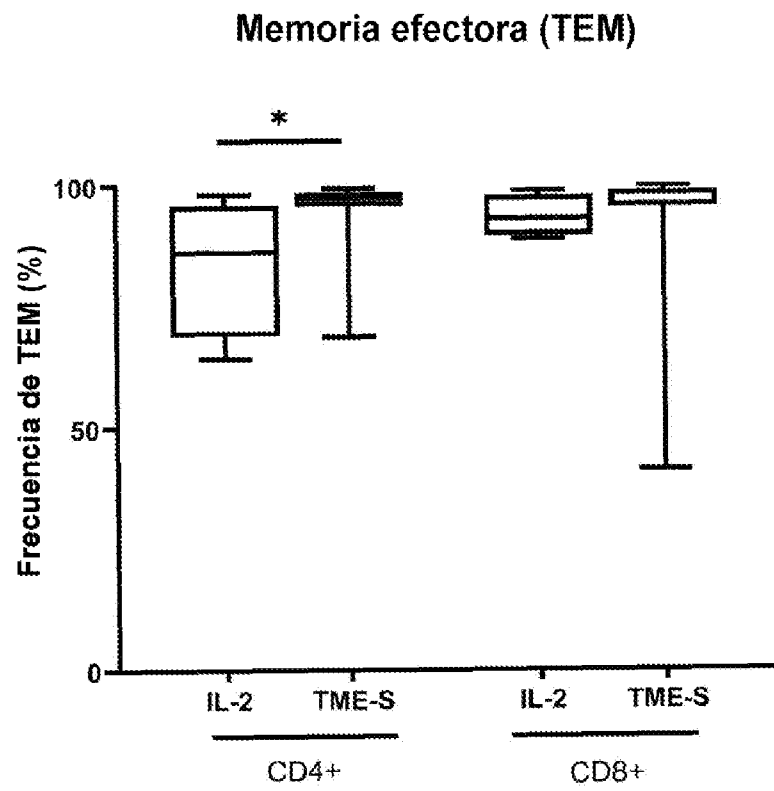


Fig 48

Distribución de grupos CD8+

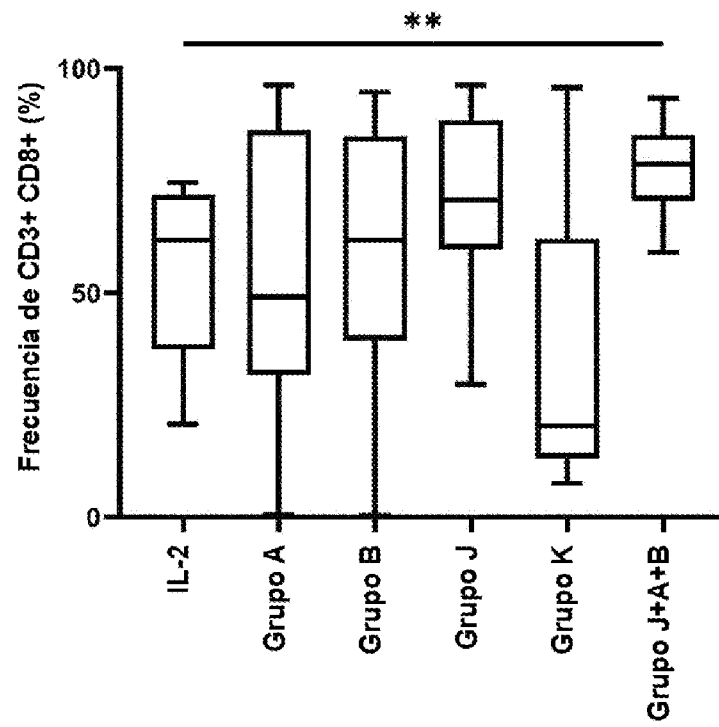


Fig 49

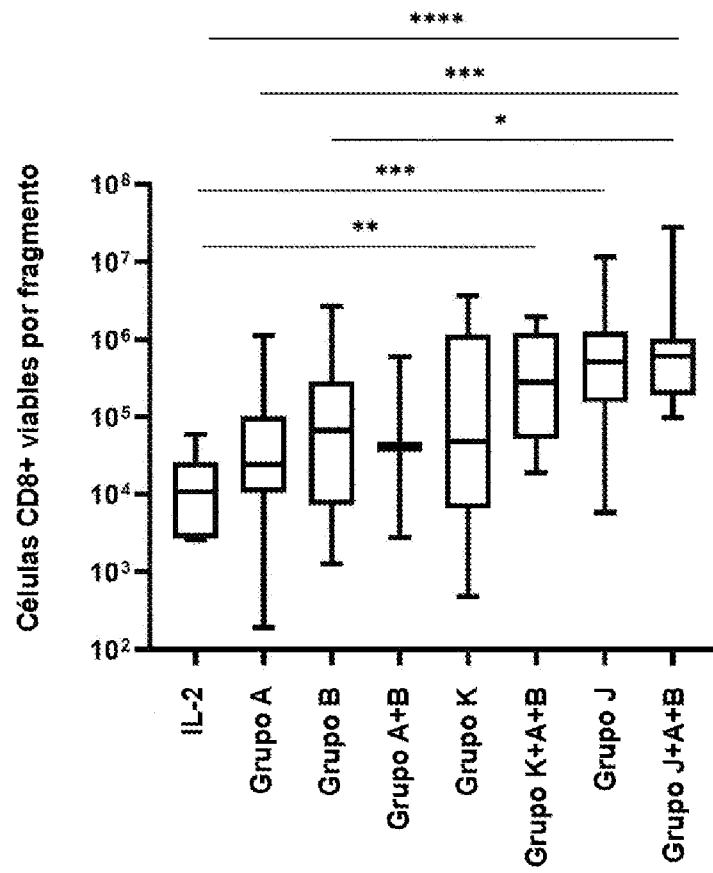


Fig 50

Distribución de grupos CD4+

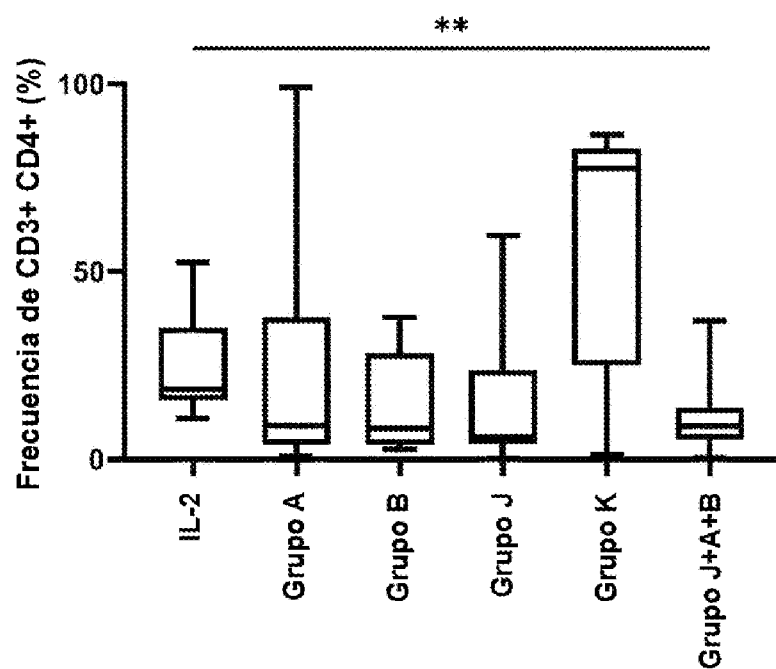


Fig 51

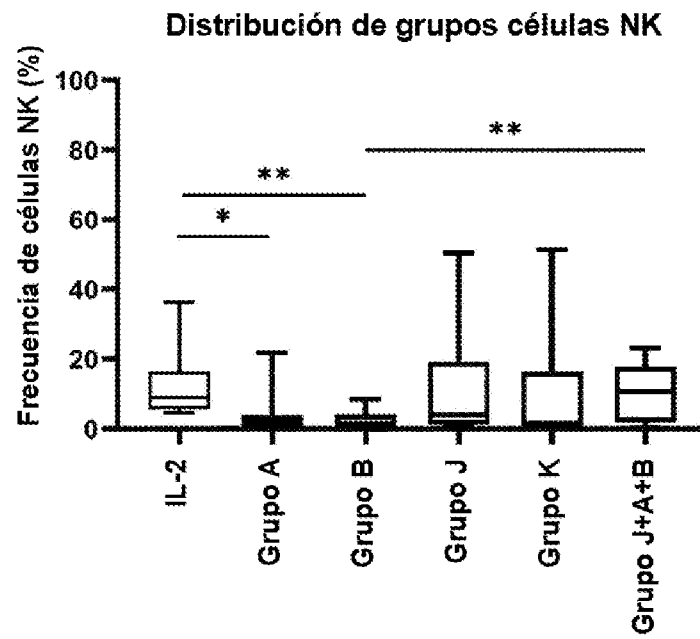


Fig 52

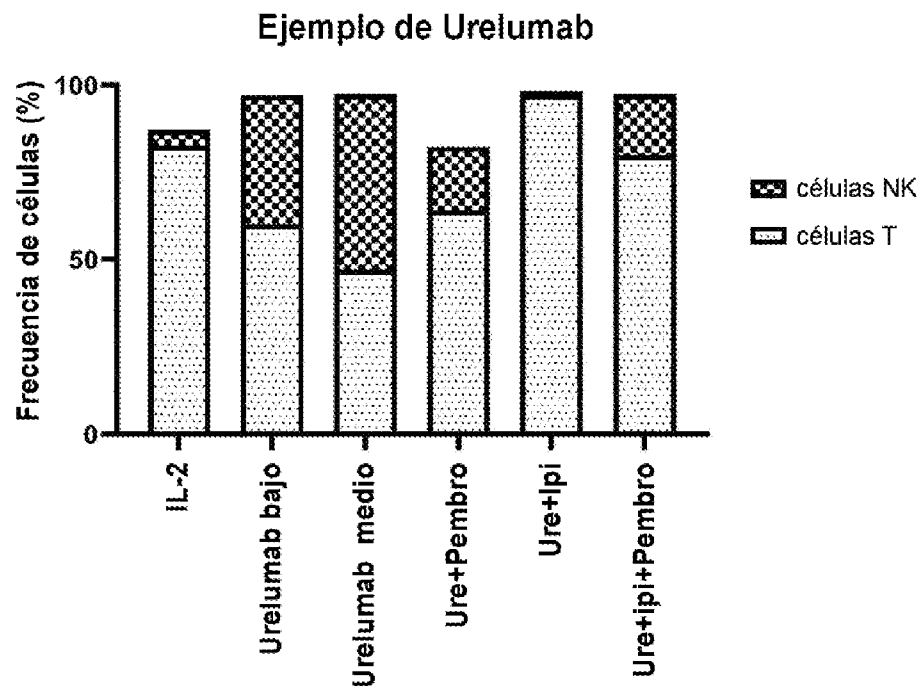


Fig 53

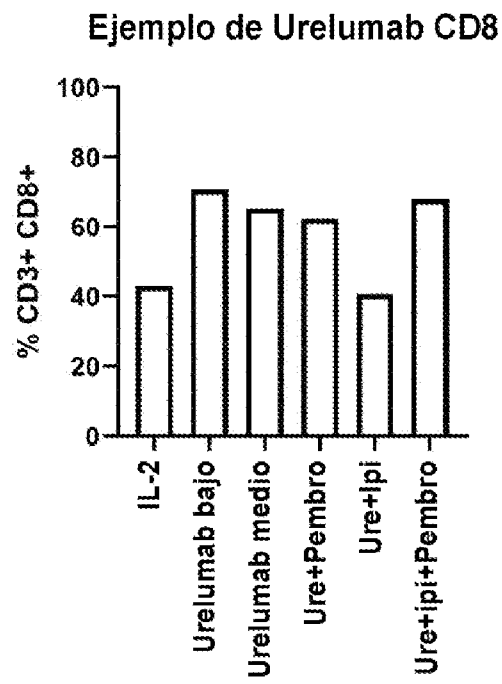


Fig 54

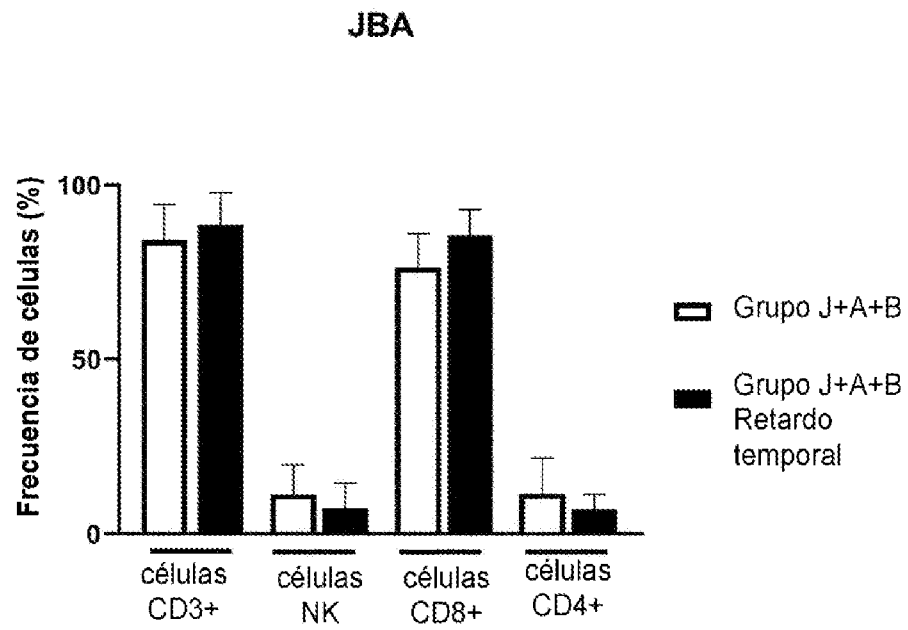


Fig 55

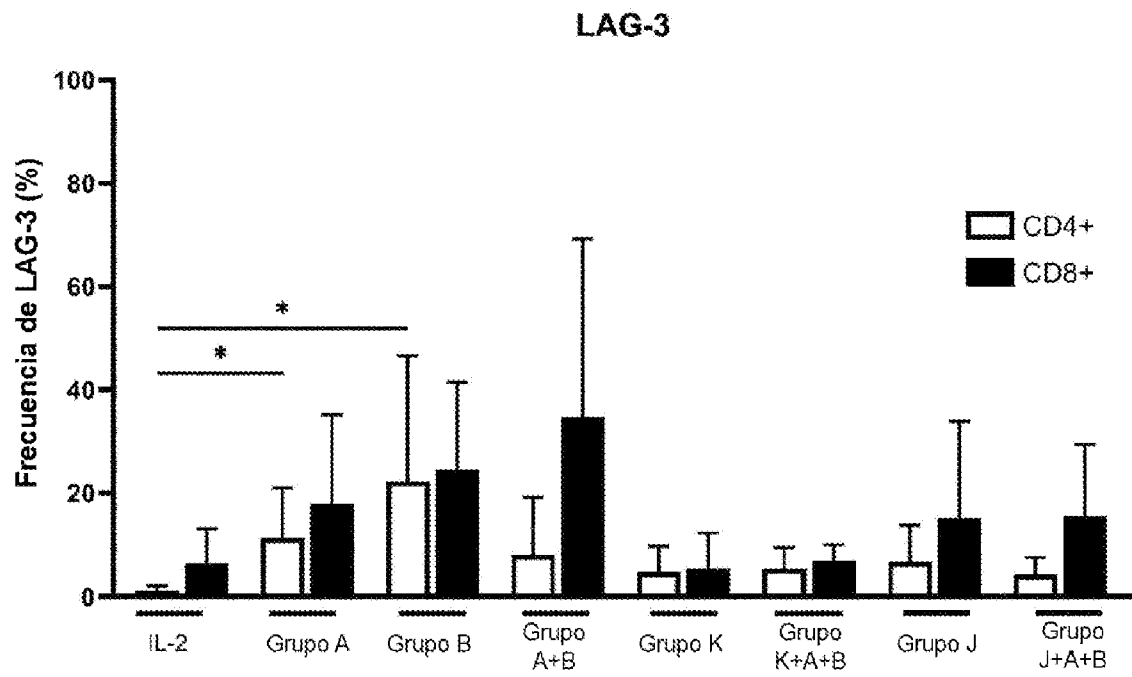


Fig 56

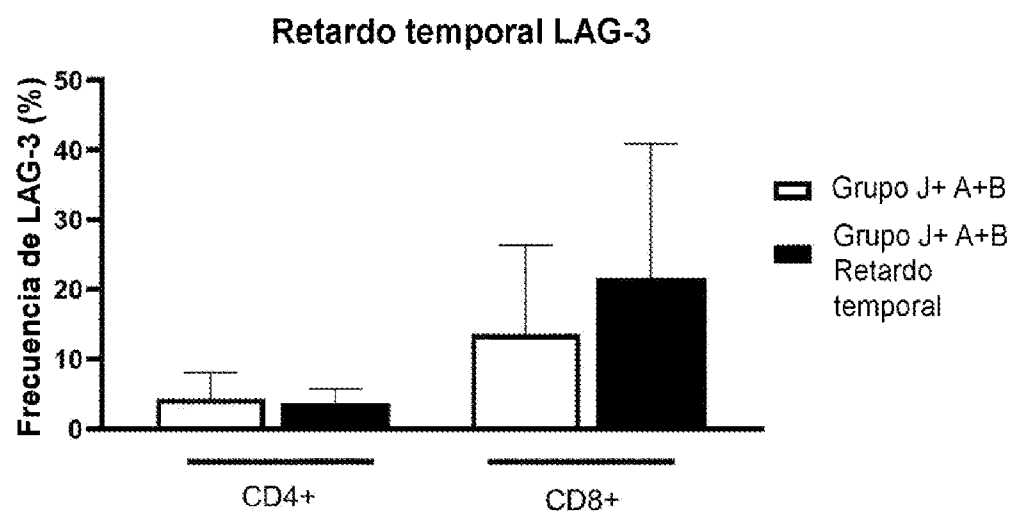


Fig 57

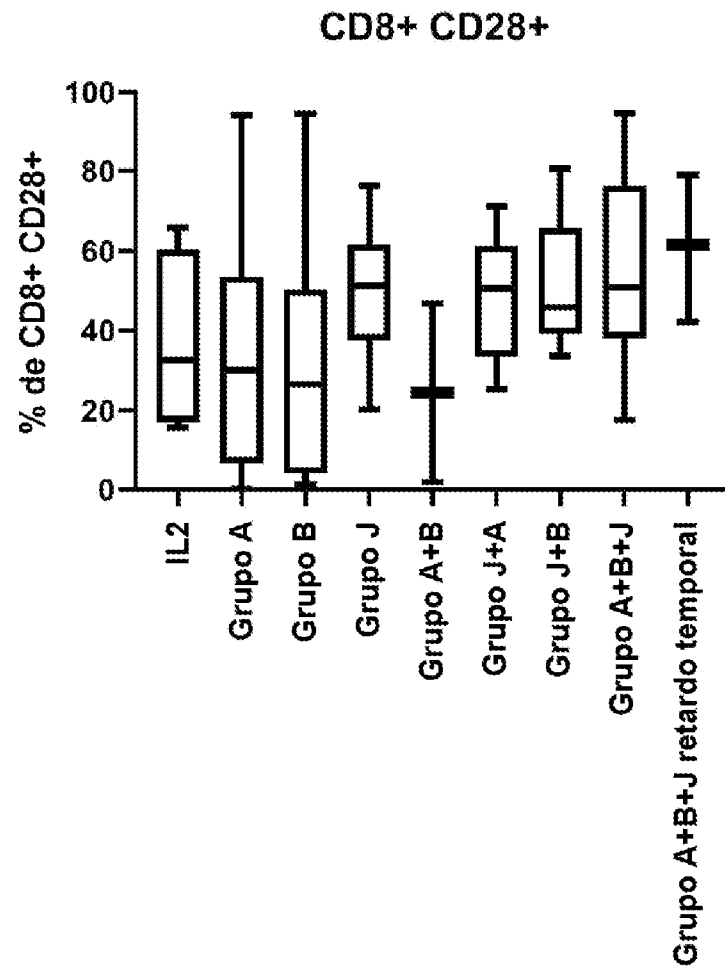


Fig 58