

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 832**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12M 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2018** **E 20161276 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024** **EP 3722415**

54 Título: **Procedimientos para la preparación de linfocitos infiltrantes de tumor y usos de los mismos en inmunoterapia**

30 Prioridad:

29.03.2017 US 201762478506 P
31.07.2017 US 201762539410 P
21.08.2017 US 201762548306 P
05.09.2017 US 201762554538 P
15.09.2017 US 201762559374 P
02.10.2017 US 201762567121 P
26.10.2017 US 201762577655 P
07.11.2017 US 201762582874 P
08.12.2017 US 201762596374 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2025

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WARDELL, SETH;
BENDER, JAMES y
LOTZE, MICHAEL, T.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 008 832 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

Procedimientos para la preparación de linfocitos infiltrantes de tumor y usos de los mismos en inmunoterapia

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 4 de enero de 2018, se denomina 116983-5017_ST25.txt y tiene un tamaño de 14 kilobytes.

Antecedentes de la invención

El tratamiento de cánceres voluminosos y refractarios usando la transferencia adoptiva de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) representa una estrategia terapéutica poderosa para pacientes con mal pronóstico. Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393. Se requiere una gran cantidad de TIL para una inmunoterapia exitosa, y se necesita un procedimiento robusto y confiable para su comercialización. Esto ha sido un desafío a lograr debido a problemas técnicos, logísticos y regulatorios con la expansión celular. La expansión de TIL basada en IL-2 seguida de un "procedimiento de expansión rápida" (REP) se ha convertido en un procedimiento preferido para la expansión de TIL debido a su velocidad y eficiencia. Dudley, et al., Science 2002, 298, 850-54; Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-57; Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39; Riddell, et al., Science 1992, 257, 238-41; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42. El REP puede resultar en una expansión de 1000 veces de TIL durante un período de 14 días, aunque requiere un gran exceso (por ejemplo, 200 veces) de células mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas (PBMC, también conocidas como células mononucleares (MNC)), a menudo de múltiples donantes, como células alimentadoras, así como anticuerpos anti-CD3 (OKT3) y altas dosis de IL-2. Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42. Los TIL que se han sometido a un procedimiento REP han producido una terapia celular adoptiva exitosa después de la inmunosupresión del huésped en pacientes con melanoma. Los parámetros de aceptación de la infusión actuales se basan en lecturas de la composición de TIL (por ejemplo, positividad para CD28, CD8 o CD4) y en la expansión múltiple y viabilidad del producto REP. La publicación de patente estadounidense No. 2012/244133 describe un procedimiento de expansión de TIL que incluye una etapa procedimental de expansión rápida de aproximadamente 14 días y una duración total desde la obtención de una muestra de tumor hasta la población de TIL expandida de entre 28 y 42 días. El documento WO2016/053338 describe un procedimiento de expansión de TILS que implica una primera expansión de TIL de entre 2 y 3 semanas y una segunda expansión de aproximadamente dos semanas.

Los procedimientos actuales de fabricación de TIL están limitados por la duración, el coste, las preocupaciones de esterilidad y otros factores descritos en el presente documento, de modo que el potencial para comercializar dichos procedimientos está severamente limitado y, por estas y otras razones, en la actualidad no se dispone de ningún procedimiento comercial. Existe una necesidad urgente de proporcionar procedimientos de fabricación y terapias de TIL basados en dichos procedimientos que sean apropiados para la fabricación a escala comercial y la aprobación regulatoria para su uso en pacientes humanos en múltiples centros clínicos.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona procedimientos mejorados y/o abreviados para expandir TIL y producir poblaciones terapéuticas de TIL. La presente invención comprende un procedimiento para expandir los linfocitos infiltrantes de tumores en una población terapéutica de TIL como se reivindica en las reivindicaciones.

También se divulga en el presente documento pero no se reivindica, un procedimiento para tratar a un sujeto con cáncer; el procedimiento comprende la administración de linfocitos infiltrantes de tumores expandidos (TIL) que comprende:

(a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor;

(b) agregar los fragmentos de tumor a un sistema cerrado;

(c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante aproximadamente 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;

(d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en la que la segunda expansión es realizada durante aproximadamente 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en la que la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL, en la que la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área de superficie permeable a los gases, y en la que la transición de la etapa (c) a la etapa (d) ocurre sin abrir el sistema;

- (e) recolectar la población terapéutica de TIL obtenida de la etapa (d), en donde la transición de la etapa (d) a la etapa (e) ocurre sin abrir el sistema; y
- (f) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (e) a una bolsa de infusión, en donde la transferencia de la etapa (e) al (f) ocurre sin abrir el sistema;
- 5 (g) opcionalmente crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada de la etapa (f) usando un procedimiento de crioconservación; y
- (h) administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL de la bolsa de infusión en la etapa (g) al paciente.
- 10 La población terapéutica de TIL recolectada en la etapa (e) puede comprender suficientes TIL para administrar una dosis terapéuticamente eficaz de los TIL en la etapa (h).
- El número de TIL suficientes para administrar una dosis terapéuticamente eficaz en la etapa (h) puede ser de aproximadamente 2.3×10^{10} a aproximadamente 13.7×10^{10} .
- Las células presentadoras de antígeno (APC) pueden ser PBMC.
- Las PBMC se pueden agregar al cultivo celular en cualquiera de los días 9 a 14 en la etapa (d).
- 15 Antes de administrar una dosis terapéuticamente eficaz de células TIL en la etapa (h), se puede haber administrado al paciente un régimen de agotamiento de linfocitos (linfodepleción) no mieloablativo.
- El régimen de linfodepleción no mieloablativa puede comprender las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de $60 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ durante dos días seguido de la administración de fludarabina a una dosis de $25 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ durante cinco días.
- 20 El procedimiento puede comprender además la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 de dosis alta comenzando el día después de la administración de las células TIL al paciente en la etapa (h).
- El régimen de IL-2 de dosis alta puede comprender 600,000 o 720,000 UI/kg administrados como infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.
- 25 La tercera población de TIL en la etapa (d) puede ser una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en la que las células T efectoras y/o las células T de memoria central en la población terapéutica de TIL exhiben una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la expresión de CD27+, la expresión de CD28+, telómeros más largos, expresión aumentada de CD57 y expresión disminuida de CD56 en relación con las células T efectoras y/o células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.
- 30 Las células T efectoras y/o las células T de memoria central en la población terapéutica de TIL pueden exhibir una expresión de CD57 aumentada y una expresión de CD56 disminuida en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.
- 35 El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), cáncer de riñón y carcinoma de células renales.
- El cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en melanoma, HNSCC, cánceres de cuello uterino y NSCLC.
- 40 El cáncer puede ser melanoma
- El cáncer puede ser HNSCC.
- El cáncer puede ser un cáncer de cuello uterino.
- El cáncer puede ser NSCLC.
- 45 La presente invención proporciona procedimientos para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende:
- (a) agregar fragmentos de tumor tratados de un tumor extirpado de un paciente a un sistema cerrado para obtener una primera población de TIL;

- (b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante 11 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (a) a la etapa (b) ocurre sin abrir el sistema;
- (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en la que la segunda expansión es realizada durante 11 días para obtener la tercera población de TIL, en la que la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL, en la que la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable a los gases, y en la que la transición de la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema y en donde las células presentadoras de antígeno se agregan a los TIL en la etapa (c) sin abrir el sistema;
- (d) recolectar la población terapéutica de TIL obtenida de la etapa (c), en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) ocurre sin abrir el sistema; y
- (e) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (d) a una bolsa de infusión, en donde la transferencia de la etapa (d) a (e) ocurre sin abrir el sistema;
- en donde la población terapéutica de TIL recolectada en la etapa (d) comprende suficientes TIL para una dosis terapéuticamente eficaz de los TIL, y en donde el procedimiento comprende además:
- (f) criopreservar la bolsa de infusión que comprende las poblaciones de TIL recolectadas de la etapa (e) usando un procedimiento de criopreservación.
- En algunas formas de realización, el número de TIL suficientes para una dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 2.3×10^{10} a aproximadamente 13.7×10^{10} .
- En algunas formas de realización, el procedimiento comprende además la etapa de criopreservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada utilizando un proceso de criopreservación.
- En algunas formas de realización, el procedimiento de criopreservación se realiza usando una relación 1: 1 de población de TIL recolectada con respecto al medio de criopreservación.
- En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígeno son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
- En algunas formas de realización, las PBMC se irradian y son alogénicas.
- En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígenos son células presentadoras de antígenos artificiales.
- En algunas formas de realización, la recolección en la etapa (d) se realiza usando un sistema de tratamiento de células LOVO.
- En algunas formas de realización, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 4 a aproximadamente 50 fragmentos, en los que cada fragmento tiene un volumen de aproximadamente 27 mm^3 .
- En algunas formas de realización, los fragmentos múltiples comprenden aproximadamente 30 a aproximadamente 60 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1300 mm^3 a aproximadamente 1500 mm^3 .
- En algunas formas de realización, los fragmentos múltiples comprenden aproximadamente 50 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1350 mm^3 .
- En algunas formas de realización, los fragmentos múltiples comprenden aproximadamente 50 fragmentos con una masa total de aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 1.5 gramos.
- En algunas formas de realización, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 4 fragmentos.
- En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo celular se proporciona en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un recipiente G y una bolsa de células Xuri.
- En algunas formas de realización, la bolsa de infusión en la etapa (e) es una bolsa de infusión que contiene HypoThermosol.

También se describe, aunque no se reivindica, un procedimiento en donde el primer período en la etapa (b) y el segundo período en la etapa (c) se realizan cada uno individualmente dentro de un período de 10 días o 12 días.

En algunas formas de realización, las etapas (a) a (e) se realizan en 22 días o menos.

- 5 En algunas formas de realización, las etapas (a) a (e) y la crioconservación se realizan en 22 días o menos.

En algunas formas de realización, las etapas (b) a (e) se realizan en un solo recipiente, en donde realizar las etapas (b) a (e) en un solo recipiente da como resultado un aumento en el rendimiento de TIL por tumor extirpado en comparación con realizar etapas (b) a (e) en más de un recipiente.

- 10 En algunas formas de realización, la tercera población de TIL en la etapa (d) es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en la que las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas en la población terapéutica de TIL exhiben una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la expresión de CD27+, la expresión de CD28+, telómeros más largos, expresión aumentada de CD57 y expresión disminuida de CD56 en relación con las células T efectoras, y/o células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.

En algunas formas de realización, las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas en la población terapéutica de TIL exhiben una expresión de CD57 aumentada y una expresión de CD56 disminuida en relación con las células T efectoras y/o células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.

- 20 En algunas formas de realización, el riesgo de contaminación microbiana se reduce en comparación con un sistema abierto.

En algunas formas de realización, los TIL de la etapa (e) son para infusión en un paciente.

En algunas formas de realización, el recipiente cerrado comprende un solo biorreactor.

En algunas formas de realización, el recipiente cerrado comprende un G-REX-10.

- 25 En algunas formas de realización, el recipiente cerrado comprende un G-REX -100.

En algunas formas de realización, en la etapa (d) las células presentadoras de antígeno (APC) se agregan al cultivo celular de la segunda población de TIL en una relación APC: TIL de 25:1 a 100:1.

En algunas formas de realización, el cultivo celular tiene una relación de 2.5×10^9 APC a 100×10^6 TIL.

- 30 En algunas formas de realización, en la etapa (c) las células presentadoras de antígeno (APC) se agregan al cultivo celular de la segunda población de TIL en una relación APC:TIL de 25:1 a 100:1.

En algunas formas de realización, el cultivo celular tiene una relación de 2.5×10^9 APC a 100×10^6 TIL.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: muestra un diagrama de una forma de realización del procedimiento 2A, un procedimiento de 22 días para la fabricación de TIL.

- 35 Figura 2: muestra una comparación entre el procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A para la fabricación de TIL.

Figura 3: muestra la línea de tiempo del procedimiento 1C.

- 40 Figura 4: muestra el procedimiento de una forma de realización de la terapia TIL que utiliza el procedimiento 2A para la fabricación de TIL, que incluye las etapas de administración y co-terapia, para recuentos de células más altos.

Figura 5: muestra el procedimiento de una forma de realización de la terapia TIL que utiliza el procedimiento 2A para la fabricación de TIL, que incluye las etapas de administración y co-terapia, para recuentos de células más bajos.

Figura 6: muestra un esquema detallado para una forma de realización del procedimiento 2A.

- 45 Figura 7: muestra la caracterización de TIL preparados usando una forma de realización del procedimiento 2A comparando la expresión de interferón-gamma (IFN- γ) entre TIL frescos y TIL descongelados.

Figura 8: muestra la caracterización de TIL preparados usando una forma de realización del procedimiento 2A examinando la expresión de CD3 en TIL frescos frente a TIL descongelados.

Figura 9: muestra la caracterización de TIL preparados usando una forma de realización del procedimiento 2A examinando la recuperación en TIL frescos frente a TIL descongelados.

- 5 Figura 10: muestra la caracterización de TIL preparados usando una forma de realización del procedimiento 2A examinando la viabilidad de TIL frescos frente a TIL descongelados.

Figura 11: Representa las etapas principales de una forma de realización del procedimiento 2A que incluye las etapas de crioconservación.

Figura 12: Representa los recuentos de células obtenidos del procedimiento 1C y una forma de realización de

- 10 Figura 13: Representa el porcentaje de viabilidad celular obtenido del procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

Figura 14: Representa los porcentajes de células CD45 y CD3 (es decir, células T) medidos por citometría de flujo para TIL obtenidos para el procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

- 15 Figura 15: Representa la liberación de IFN- γ obtenida para el procedimiento 1C y formas de realización del procedimiento 2A, medida mediante un ensayo diferente al utilizado para generar los datos en las Figuras 80 y 98.

Figura 16: Representa la liberación de IFN- γ obtenida para el procedimiento 1C y las formas de realización del procedimiento 2A, medida mediante un ensayo diferente al utilizado para generar los datos en las Figuras 80 y 98.

- 20 Figura 17: Representa los porcentajes de células TCR a/b y NK obtenidas del procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

Figura 18: Representa los porcentajes de células CD8⁺ y CD4⁺ medidos por citometría de flujo para TIL obtenidos mediante el procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A, así como la relación entre cada subconjunto.

- 25 Figura 19: Representa porcentajes de subconjuntos de memoria medidos por citometría de flujo para TIL obtenidos del procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

Figura 20: Representa los porcentajes de expresión de PD-1, LAG-3 y TIM-3 mediante citometría de flujo para TIL obtenidos del procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

- 30 Figura 21: Representa los porcentajes de expresión de 4-1BB, CD69 y KLRG1 por citometría de flujo para TIL obtenidos del procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

Figura 22: Representa los porcentajes de expresión de TIGIT por citometría de flujo para TIL obtenidos del procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

Figura 23: Representa los porcentajes de expresión de CD27 y CD28 por citometría de flujo para TIL obtenidos del procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

- 35 Figura 24: Representa los resultados del análisis de la longitud de los telómeros de flujo-FISH.

Figura 25: Representa los resultados del análisis de la longitud de los telómeros de flujo-FISH (después de eliminar un punto de datos atípico).

Figura 26: Representa el diseño del ensayo clínico, incluidas las cohortes tratadas con el procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

- 40 Figura 27: Diagrama de procedimiento ejemplar 2A que ofrece una descripción general de las etapas A a F.

Figura 28: Diagrama de flujo del procedimiento del procedimiento 2A.

Figura 29: Diagrama de flujo del procedimiento en el plan de recopilación de datos del procedimiento 2A

Figura 30: Viabilidad de TIL fresco frente a descongelado

Figura 31: Expansión de TIL fresco y descongelado en cultivo re-REP

- 45 Figura 32: Valores normales de laboratorio de metabolitos sanguíneos.

Figura 33: Análisis de metabolitos del TIL pre-REP de procedimiento 2A.

Figura 34: Cuantificación de IL-2 en cultivo de células TIL pre-REP del procedimiento 2A.

Figura 35: Liberación de citocinas citotóxicas IFN- γ tras la estimulación anti-CD3, anti-CD28 y anti-4-1BB de TIL.

5 Figura 36: Liberación de Granzima B después de la estimulación anti-CD3, anti-CD28 y anti-4-1BB de TIL.

Figura 37: TCR $\alpha\beta$ + TIL. La mayoría de las células T CD3+ humanas expresan los receptores formados por cadenas α y β que reconocen antígenos de una manera restringida por MHC. A) Excepto en M1061, el producto TIL fresco y descongelado tenía 80% o más de TCR $\alpha\beta$ que expresan TIL. Tanto el TIL fresco como el descongelado tenían una expresión comparable de TCR $\alpha\beta$ (valor p = 0.9582). A pesar de que se observó una
10 disminución en el TCR $\alpha\beta$ que expresa TIL después del Re-REP, esta disminución no fue significativa dentro del Re-REP TIL (p = 0.24). B) Hubo una disminución del 9.2% y del 15.7% en el RE-REP TIL fresco y descongelado que expresa TCR $\alpha\beta$ en comparación con el TIL fresco y descongelado, respectivamente.

Figura 38: TCR $\alpha\beta$ -CD56+. Las células Natural Killer (NK) y NKT que se infiltran en el tumor también tienen la capacidad de lisar las células que carecen de expresión de MHC, así como el antígeno lipídico presentado por CD1 y de proporcionar citocinas inmunorreguladoras. Sin embargo, una infiltración intensa de células NK se asocia con una enfermedad avanzada y podría facilitar el desarrollo del cáncer. La Figura A muestra que, en todos los casos, excepto en M1063, hubo una disminución modesta, aunque no significativa, en la población de NK en TIL descongelado en comparación con TIL fresco, (p = 0.27). No se observaron diferencias significativas entre la población re-REP TIL (p = 0.88). TIL fresco, re-REP TIL fresco y re-REP TIL descongelado demuestran una expresión similar de CD56 como se muestra en la Figura B. El producto TIL descongelado tenía menos (1.9 ± 1.3) células que expresan NK que TIL fresco (3.0 ± 2.2) posiblemente como resultado del procedimiento de congelación criogénica.
15
20

Figura 39: Células CD4+. No se observaron diferencias sustanciales en la población de CD4 en condiciones individuales. La Figura A representa la población CD4 promedio en cada condición. La tabla de la Figura B muestra los valores SD y SEM. Hay una ligera disminución en la población de CD4 en la población de re-REP fresco que se debe principalmente a una disminución de CD4 en la población de re-REP fresco en EP11001T.
25

Figura 40: Células CD8+. A) En todos, excepto EP11001T, tanto el TIL fresco como el descongelado mostraron poblaciones CD8+ comparables (p = 0.10, sin diferencia significativa). En la mayoría de los experimentos, hubo una ligera disminución en el CD8+ que expresa TIL en el producto fresco re-REP TIL (las excepciones fueron M1061T y M1065T). Hubo aproximadamente una disminución del 10-30% en la población de CD8+ en el re-REP TIL descongelado. La comparación del re-REP TIL de TIL fresco y descongelado mostró una diferencia significativa (p = 0.03, prueba t de Student). La Figura B muestra los valores medios de CD8+ que expresa TIL en todas las condiciones. Tanto el TIL fresco como el descongelado muestran resultados similares. Sin embargo, hubo una disminución del 10.8% en la población CD8+ en el producto descongelado re-REP TIL en comparación con el re-REP TIL fresco.
30
35

Figura 41: Células CD4+CD154+. CD154, también conocido como CD40L, es un marcador de células T activadas. Figura A: No se observó una diferencia sustancial en la población CD4+CD154+ en las diferentes condiciones; sin embargo, se observó una disminución del 34,1% en los re-REP CD4+ TIL frescos de EP11001T. La expresión de CD154 no se midió en M1061T y M1062T ya que estos experimentos se llevaron a cabo antes de tener lugar el panel de fenotipo extendido. Figura B: Una ligera disminución en la condición de TIL descongelado podría atribuirse a CD154 no medido en M1061T y M1062T. Todas las condiciones muestran una expresión de CD154 muy comparable en la población de CD4, lo que sugiere células T CD4+ activadas.
40

Figura 42A-42B: células CD8+CD154+. También se analizó el marcador de activación CD154 expresado en CD8+ TIL. A) En general, la expresión de CD154 fue menor en la población CD8+ en el producto TIL fresco y descongelado. Esto no es sorprendente ya que CD154 se expresa principalmente en las células T CD4+ activadas. En los casos en los que se midió la expresión de CD154 tanto en el producto TIL fresco como en el descongelado, no se observó diferencia o un aumento en la expresión de CD154 en los productos TIL descongelados. La prueba t de Student mostró que no había diferencias significativas entre las dos condiciones. En todos los experimentos se mostró un aumento en la expresión de CD154 en el re-REP descongelado en comparación con el re-REP fresco (p = 0.02). B) Se observó un aumento en la expresión de CD154 en los productos TIL descongelados y re-REP TIL descongelados en comparación con sus contrapartes. El re-REP TIL descongelado mostró un aumento del 29.1% en la expresión de CD154 en comparación con el re-REP TIL fresco.
45
50

Figura 43A-43B: células CD4+CD69+. CD69 es el marcador de activación temprana en las células T después de la estimulación o activación. A) En todos los TIL excepto en EP11001T, tanto el re-REP fresco como el descongelado mostraron un aumento modesto en la expresión de CD69, posiblemente debido a la duración del re-REP (7 días en lugar de 11 días). No se observaron diferencias entre TIL fresco y descongelado (p = 0.89). Tampoco se observó una diferencia entre re-REP fresco y descongelado (p = 0.82). B) Se observa un aumento
55

menor en la expresión de CD69 en los productos re-REP TIL. (Nota: No se realizó tinción con CD69 para el producto TIL descongelado M1061T y M1062T. La expresión de CD69 del producto TIL fresco M1061T fue del 33.9%).

5 Figura 44A-44B: células CD8+CD69+. Como se observa para la población de CD4+, la Figura A muestra un aumento en la expresión de CD69 en el CD8+ re-REP TIL. La expresión de CD69 no mostró diferencias significativas entre el TIL fresco y descongelado ($p = 0.68$) o el re-REP TIL fresco y descongelado ($p = 0.76$). La Figura B apoya la observación de que hay un aumento modesto en la expresión de CD69 en el producto re-REP TIL.

10 Figura 45A-45B: células CD4+CD137+. CD137 (4-11313) es un receptor coestimulador de células T inducido tras la activación de TCR. Se activa en las células T CD4+ y CD8+. A) La expresión de CD137 mostró un profundo aumento en la población re-REP TIL después de 7 días de estimulación. Sin embargo, no se observaron diferencias entre el TIL fresco y descongelado o el re-REP TIL fresco y descongelado ($p < 0.05$ en ambos casos, la Figura B apoya esta observación). Además, el TIL descongelado mostró una modesta disminución en la expresión de CD137. El aumento en la expresión de CD137 en re-REP TIL podría atribuirse a la segunda ronda de estimulación del re-REP de 7 días.

15 Figura 46A-46B: células CD8+CD137+. A) La población de CD8+ mostró un aumento general en el producto re-REP. B) El producto re-REP fresco tuvo un aumento del 33.4% en la expresión de CD8+ CD137+ en comparación con el producto TIL fresco. El producto re-REP descongelado también mostró un aumento del 33.15% en la expresión de CD137 en la población CD8+ en comparación con TIL descongelado. No se observaron diferencias significativas entre re-REP TIL fresco y descongelado. Se puede ver una observación similar comparando el TIL fresco con el producto TIL descongelado. Este aumento en la expresión de CD137 podría deberse a la segunda ronda de activación del re-REP. (Nótese que solo se usaron 6 TIL para el análisis ya que la expresión de CD137 no se midió para 3 de los experimentos).

20 Figura 47A-47B: células CD4+CM. La población de memoria central (CM) se define por la expresión de CD45RA- (negativo) y CCR7+ (positivo). A) Se observó un aumento en la población de CM en las condiciones de re-REP. M1063T y M1064T mostraron una disminución en la expresión de CM en la población de CD4+ obtenida de TIL descongelado en comparación con el producto de TIL fresco. Ni el producto TIL fresco y descongelado ($p = 0.1658$) ni el re-REP fresco y re-REP TIL descongelado ($p = 0.5535$) mostraron una diferencia significativa en la población de CM. B) Se observó un aumento del 14.4% y del 15.4% en la población de CM en el Re-REP TIL fresco y descongelado en comparación con el TIL fresco y descongelado, respectivamente.

25 Figura 48A-48B: células CD8+CM. A) En la población CD8+, se observó un aumento drástico en la expresión de CM en el producto TIL fresco, una observación que no estaba presente en el producto TIL. Este aumento no afectó la significación ($p = 0.3086$), lo que sugiere que no hay diferencia entre el TIL fresco y descongelado. También se observó una tendencia similar en los productos re-REP TIL. Figura 48B). Se observó un aumento general de la población de CM en el TIL fresco en comparación con el TIL descongelado. Los números muestran que TIL y re-REP TIL frescos tenían solo una diferencia de -2%; el TIL fresco mostró una desviación estándar muy alta que podría atribuirse a M1064T; excluir la expresión de CM en M1064T dio como resultado una expresión de CM muy similar entre el producto TIL fresco y descongelado (no mostrado).

30 Figura 49A-49B: células CD4+EM. La población de memoria efectora (EM) se define por la falta de expresión de CCR7 y CD45RA. A) Como se esperaba, la población CD4+ de TIL fresco y descongelada tenía un alto nivel de fenotipo de memoria efectora. Se encontró una disminución drástica en la expresión de la memoria efectora en la población M1056T re-REP TIL. Además, otros 5 experimentos mostraron una disminución en el fenotipo de memoria efectora en re-REP TIL tanto fresco como descongelado. B) Tanto el TIL fresco como el descongelado mostraron una expresión similar del fenotipo de memoria efectora. La comparación de Re-REP TIL fresco y fresco mostró una disminución del 16% en este último. Se observó una disminución similar en el Re-REP TIL descongelado (9%) en comparación con el TIL descongelado.

35 Figura 50A-50B: células CD8+EM. A) También se observó un patrón similar de aumento de la memoria efectora en el TIL fresco en la población CD8+. Se observó una excepción en el M1064T en donde el TIL fresco solo tenía un perfil de memoria efectora del 20%; esto se debe a que el 73% de estos TIL tienen un fenotipo CM como se describe en A y B. Todas las muestras que muestran una disminución en la población de memoria efectora en su CD4+ TIL del producto re-REP siguieron la misma tendencia en su CD8+ TIL. B) A diferencia de la población de CD4+ TIL, CD8+ TIL mostró un fenotipo de memoria efectora similar en productos frescos, descongelados y re-REP. (Nótese la alta desviación estándar en el TIL fresco y descongelado, que se debe a la población de memoria efectora baja en M1064T fresco y a la ausencia de expresión en las muestras de TIL descongelados de M1061T).

Figura 51A-51B: células CD4+CD28+. La expresión de CD28 se correlaciona con la disminución de TIL joven con la edad. A) Aunque se observó un aumento en la población de CM en el re-REP TIL, una disminución en la expresión de CD28 se vio como una tendencia que sugiere que el estado de CM por sí solo no podría

determinar el destino de TIL. Se observó una disminución en la expresión de CD28 en el producto -re-REP, excepto para M1061T CD4+TIL. B) Se observó una disminución del 8.89% en el TIL fresco y del 5.71% en el TIL descongelado en comparación con el producto TIL fresco y descongelado, respectivamente.

Figura 52A-52B: células CD8+ CD28+. A) La expresión de CD28 en la población de TIL CD8+ fue mayor en el producto TIL fresco y descongelado que en el producto re-REP. En la mayoría de los casos, el re-REP TIL descongelado mostró una disminución drástica en comparación con el TIL descongelado y el re-REP TIL fresco. Sin embargo, la prueba t de Student no mostró diferencias significativas entre TIL fresco y descongelado ($p = 0.3668$) y también entre los productos re-REP frescos y descongelados ($p = 0.7940$). B) Como se ve en la población TIL CD4+, hubo una disminución en las poblaciones de CD8+ CD28+ en el re-REP fresco (21.5%) y el re-REP descongelado (18.2%) en comparación con sus contrapartes no reestimuladas.

Figura 53A-53B: células CD4+PD-1+. La expresión de PD-1 en TIL se correlaciona con células T agotadas y reactivas al antígeno. Por tanto, no es de extrañar que se observe un fenotipo agotado en TIL que se han sometido a un REP durante 11 días. A) Este fenotipo agotado se mantuvo o aumentó (específicamente, EP11001T y M1056T) en el producto TIL descongelado. No se observaron diferencias significativas entre el producto TIL fresco y descongelado ($p = 0.9809$). Se mostró una tendencia similar en el re-REP TIL fresco en comparación con el descongelado ($p = 0.0912$). B) El re-REP fresco mostró una modesta disminución en la expresión de PD-1 en la población de TIL CD4+. Todas las demás condiciones mantuvieron un patrón de expresión de PD-1 comparable. Se observó una disminución o ningún cambio en la expresión de PD-1 en el producto re-REP fresco en comparación con todas las demás condiciones. Se observó un aumento en la expresión de PD-1 en M1062T, M1063T (CD4+) y EP11001T (CD8+) en el producto re-REP descongelado. Todos los demás productos descongelados re-REP mostraron resultados comparables a los del producto descongelado.

Figura 54A-54B: células CD8+ PD-1+. A) La población de CD8+ del producto TIL fresco mostró un fenotipo más agotado asociado con un aumento de la expresión de PD-1. Se observó una excepción en EP11001T donde el producto TIL descongelado CD8+ tuvo un aumento modesto en la expresión de PD-1 en comparación con el producto TIL fresco. Hubo una diferencia pequeña, aunque no significativa, en la expresión de PD-1 en el TIL fresco en comparación con el TIL descongelado ($p = 0.3144$). B) El producto TIL fresco mostró un ligero aumento, pero una expresión de PD-1 no significativa en comparación con TIL descongelado (6.74%, o 1,2 veces más alto que TIL descongelado), lo que sugiere que el producto TIL descongelado era comparable en base al patrón de fenotipo.

Figura 55A-55B: células CD4+LAG3+. Las células T agotadas expresan altos niveles de receptor inhibidor LAG3 junto con PD-1. A) El TIL descongelado CD4+ mostró niveles ligeramente más altos, pero no significativos, de expresión de LAG3 en comparación con el TIL fresco ($p = 0.52$). Se observó una excepción en M1063T. En experimentos en los que se midió la expresión de LAG3 en CD4+ fresco y re-REP TIL fresco, se observó una disminución en la expresión de LAG3+ en las muestras de re-REP fresco en comparación con TIL fresco. B) En general, hay una modesta disminución en la expresión de LAG3 en el producto fresco re-REP TIL. Nótese que para que la Figura B se mantenga consistente, se excluyeron M1061T, M1062T y M1064T ya que la expresión de LAG3 no se midió en el producto fresco.

Figura 56A-56B: células CD8+LAG3+. A) CD8+LAG3+ que expresa TIL mostró una modesta disminución en los experimentos, con la excepción de M1063T en donde se observó una marcada disminución en la expresión de LAG3 en el re-REP TIL fresco. En general, el re-REP TIL descongelado mostró un aumento significativo de 1.5 veces en comparación con el re-REP TIL fresco para la expresión de LAG3 ($p = 0.0154$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los productos TIL frescos y descongelados ($p = 0.0884$). B) Se observó una disminución de aproximadamente el 30% en la expresión de LAG3 en el CD8+ TIL de re-REP fresco en comparación con el producto TIL descongelado. Tanto el TIL fresco como el descongelado fueron comparables al TIL descongelado que mostró un modesto aumento. (En esta figura, se omitieron M1061T, M1062T y M1064T ya que la expresión de LAG3 no se midió en las muestras frescas o de re-REP TIL fresco).

Figura 57A-57B: células CD4+TIM-3+. A) Como se observó previamente en el caso de PD-1 y LAG3, se observó una disminución en la expresión de TIM-3 en el reREP TIL fresco en comparación con el re-REP TIL descongelado. Independientemente, no existieron diferencias significativas entre reREP TIL fresco y descongelado ($p = 0.2007$). B) No se observaron cambios importantes en la expresión de TIM-3 entre los productos reREP TIL frescos, descongelados y descongelados. Se observó una modesta disminución del 9.2% en la expresión de TIM-3 en el reREP TIL fresco en comparación con el producto reREP descongelado.

Figura 58A-58B: células CD8+TIM-3+. A) Una tendencia similar en la expresión de TIM-3 que se observó en la población CD4+ también se observó en el CD8+ TIL. Re-REP TIL fresco tuvo el fenotipo menos agotado con baja expresión de TIM-3, que mostró una diferencia significativa en comparación con re-REP TIL descongelado ($p = 0.0147$). La comparación de PD-1, LAG3 y TIM-3 sugiere que el REP TIL fresco tenía un fenotipo menos exhaustivo con un fenotipo de CM aumentado. B) En comparación con el producto re-REP TIL descongelado, el re-REP TIL fresco mostró una disminución significativa del 22% en la expresión de TIM-3. Tanto el TIL fresco como el descongelado muestran patrones de expresión TIM-3 similares.

Figura 59: Potencial citotóxico de TIL contra la línea celular diana P815.

Figura 60A-60F: Perfil de respiración metabólica de TIL fresco, Re-REP TIL fresco y Re-REP TIL descongelado. OCR basal (A), SRC abierta (B), SRC2DG (C), SRC encubierta (D), ECAR basal (E) y reserva glicolítica (F).

Figura 61A-61B: Se usó la tecnología Flow-FISH para medir la longitud promedio de la repetición del telómero en 9 productos TIL descongelados de procedimiento post-REP 2A. A) Los datos representan la longitud de los telómeros medida por qPCR comparando TIL con 1301 células. B) Los datos muestran la longitud de los telómeros medida por el ensayo Flow Fish de TIL en comparación con 1301 células. Los datos utilizados para los gráficos se proporcionan en formato de tabla (Tablas 25) en la sección 10 del apéndice. En general, hubo una similitud aproximada en los patrones de los resultados de los dos ensayos de longitud de telómeros, pero los experimentos continuarán determinando qué procedimiento refleja con mayor precisión la longitud real de los telómeros del TIL. Esta técnica podría aplicarse a futuras muestras clínicas para determinar una relación entre la longitud de los telómeros y la respuesta del paciente a la terapia TIL.

Figura 62A-62B: Selección del proveedor de medios sin suero (reemplazo de suero). Cada fragmento se cultivó en un solo pocillo de una placa de 24 pocillos G-Rex en cuadruplicados. En el día 11, se iniciaron REP usando 4^5 TIL con 10^6 alimentadoras para imitar el procedimiento 2A. A) Gráfico de barras que muestra el recuento medio de células viables registrado el día 11 (preREP) para cada condición. B) Gráfico de barras que muestra el recuento medio de células viables registrado el día 22 (postREP). El valor de p se calculó mediante la prueba t de Student. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 respectivamente.

Figura 63A-63B: Selección del proveedor de medios libres de suero (suero de lisado de plaquetas). Cada fragmento se cultivó en un solo pocillo de una placa de 24 pocillos G-Rex por triplicado. El día 11 se iniciaron REP usando 4^5 TIL con 10^6 alimentadoras para imitar el procedimiento 2A. A) Gráfico de barras que muestra el recuento medio de células viables registrado el día 11 (preREP) para cada condición. B) Gráfico de barras que muestra el recuento medio de células viables registrado el día 22 (postREP). El valor de p se calculó mediante la prueba t de Student. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 respectivamente. # No hay suficientes fragmentos tumorales.

Figura 64A-64B: Comparar la eficacia del CTS Optimizer con la condición estándar usando el procedimiento 2A a mini escala (G-Rex 5M). Se cultivaron dos fragmentos/G-Rex 5M por triplicado, se iniciaron REP usando 2^6 TIL con 50^6 alimentadoras para imitar el procedimiento 2A. Las barras presentadas anteriormente fueron el recuento promedio de células viables obtenido el día 11 (A) o el día 22 (B).

Figura 65A-65C: Resumen de la expansión previa y posterior a TIL extrapolada comparando la condición estándar y el Optimizador de CTS. A) PreREP. B) PostREP. C) Resumen de la expansión de TIL extrapolada a la ejecución a escala completa (Estándar vs CTS Optimizer + SR).

Figura 66: CD8+ se activó en células vivas. 7 de los 9 tumores muestran un aumento en las poblaciones absolutas de CD8+ con la condición CTS+SR.

Figura 67: Comparabilidad de interferón-gamma. ELISA de interferón-gamma (Quantikine). La producción de IFN- γ se midió utilizando el kit Quantikine ELISA mediante sistemas de R&D. CTS+SR produjo cantidades comparables de IFN- γ en comparación con nuestra condición estándar.

Figura 68: Esquema de una forma de realización ejemplar del Protocolo de expansión rápida (REP). A su llegada, el tumor se fragmenta, se coloca en matraces de G-Rex con IL-2 para la expansión de TIL (expansión pre-REP), durante 11 días. Para los estudios de triple cóctel, se agrega IL-2/IL-15/IL-21 al inicio del pre-REP. Para el Protocolo de expansión rápida (REP), se cultivan TIL con alimentadores y OKT3 para la expansión de REP durante 11 días adicionales.

Figura 69: TIL derivado de melanoma (n=4) y pulmón (n=7) se evaluaron fenotípicamente para células CD4+ y CD8+ usando citometría de flujo post pre-REP. Los valores *p representan la diferencia entre IL-2 e IL-12/IL-15/IL-21 en las células CD8+ utilizando la prueba t para datos no apareados de Student.

Figura 70: TIL derivado de melanoma (n=4) y pulmón (n=7) se evaluaron fenotípicamente para CD27+ y CD28+ en las células CD4+ y CD8+ usando citometría de flujo post pre-REP.

Figura 71A-71B: TIL se evaluó fenotípicamente para subconjuntos efector/memoria (CD45RA y CCR7) en las células CD8+ y CD4+ (datos no mostrados) en melanoma (n=4) (A) y pulmón (n=8) (B). Se evaluó la expresión de CXCR3 en melanoma y pulmón. Toda la expresión fenotípica se evaluó mediante citometría de flujo post-REP. TCM=memoria central, TSCM=memoria de células madre, TEMRA (células T efectoras), TEM=memoria efectora.

Figura 72A-72C: Se evaluó la expresión de CD107a+ de TIL derivada de (A) melanoma (n=4) y (B) pulmón (n=5) en respuesta a la estimulación de PMA durante 4 horas en las células CD4+ y CD8+, mediante citometría

de flujo. (C) pre-REP TIL (n=5) se estimularon durante 24 horas con OKT3 soluble (30 ng/ml) y los sobrenadantes se evaluaron para IPN γ mediante ELISA.

Figura 73A-73B: Se evaluó el repertorio de TCR $\nu\beta$ (24 especificidades) en el TIL derivado de melanoma (A) y pulmón (B) usando el kit Beckman Coulter para citometría de flujo.

5 Figura 74: Procedimiento de fabricación ejemplar de TIL crioconservado (-22 días).

Figura 75A-75B: el día 22, el producto celular de volumen reducido se agrupa y se toman muestras para determinar el rendimiento del cultivo antes del lavado y la formulación. Las muestras se analizan en el contador celular automático NC-200 como se describió anteriormente. La densidad de células viables total se determina mediante la gran media de recuentos duplicados de 4 muestras independientes. El procedimiento de
10 Generación 2 (Gen 2) produce un producto TIL de dosis similar a la Generación 1 (Gen 1; la media de Gen 1 = $4.10 \times 10^{10} \pm 2.92 \times 10^{10}$, media de Gen 2 = $3.12 \times 10^{10} \pm 2.19 \times 10^{10}$). B) La expansión múltiple se calcula para la fase REP como el dividendo de la densidad de células viables final sobre la densidad de siembra de TIL viable inicial. Los productos TIL Gen 2 tienen una expansión menor en relación con Gen 1 (media de Gen 1 = $1.40 \times 10^3 \pm 9.86 \times 10^2$, media de Gen 2 = $5.11 \times 10^2 \pm 2.95 \times 10^2$).

15 Figura 76: Se ensayó la identidad de productos farmacéuticos recién formulados mediante citometría de flujo para su liberación. Los procedimientos Gen 1 y Gen 2 producen cultivos de células T de alta pureza según lo definido por el fenotipo CD45, CD3 doble positivo (Gen1 # $\pm$ SD, Gen 2 # $\pm$ SD). El valor de p se calculó utilizando la prueba 't' de Mann-Whitney.

20 Figura 77: Los viales satélites crioconservados del producto farmacéutico formulado se descongelaron y se analizaron para determinar el fenotipo extendido mediante citometría de flujo como se describió anteriormente. Los productos Gen 1 y Gen 2 expresan relaciones similares de subtipos de células T CD8 a CD4. El valor de p se calculó utilizando la prueba 't' de Mann-Whitney.

Figura 78: Los viales satélites crioconservados del producto farmacéutico formulado se descongelaron y se analizaron para determinar el fenotipo extendido mediante citometría de flujo como se describió anteriormente. Los productos Gen 1 y Gen 2 expresan niveles similares de moléculas coestimuladoras CD27 y CD28 en subconjuntos de células T. El valor de p se calculó mediante la prueba t de Mann-Whitney. Se requieren moléculas coestimuladoras tales como CD27 y CD28 para suministrar la señalización secundaria y terciaria necesaria para la proliferación de células efectoras en el acoplamiento del receptor de células T.
25

Figura 79: Se utilizó la tecnología Flow-FISH para medir la longitud promedio de la repetición del telómero como se describió anteriormente. El valor de RTL anterior indica que la fluorescencia de telómero promedio por cromosoma/genoma en Gen 1 (una forma de realización del procedimiento 1C) es # % $\pm$ SD%, y Gen 2 es # % $\pm$ SD% de la fluorescencia de telómero por cromosoma/genoma en la línea de células de control (línea de células de leucemia 1301). Los datos indican que los productos Gen 2 en promedio tienen al menos longitudes de telómero comparables a las de los productos Gen 1. La longitud de los telómeros es una medida sustituta de la longitud del cultivo celular ex vivo.
30
35

Figura 80: Los productos farmacéuticos Gen 2 (una forma de realización del procedimiento 2A) exhiben una mayor capacidad de producir IFN- γ en relación con los productos farmacéuticos Gen 1. La capacidad del fármaco para reactivarse y secretar citocinas es una medida sustituta de la función in vivo tras la unión del TCR al antígeno afín en el contexto de HLA.

40 Figura 81: Diversidad del receptor de células T: se analizaron ARN de 10×10^6 TIL de Gen 1 (una forma de realización del procedimiento 1C) y Gen 2 (una forma de realización del procedimiento 2A) para determinar el número total y la frecuencia de secuencias de CDR3 únicas presentes en cada producto. A) El número total de secuencias CDR3 únicas presentes en cada producto (Gen 1 n=#, media $\pm$ SD, Gen 2 n=#, media $\pm$ SD). B) Se indexaron secuencias únicas de CDR3 en relación con la frecuencia en cada producto para producir una clasificación representativa de la diversidad relativa de receptores de células T en el producto. Los productos
45 TIL de ambos procedimientos están compuestos por poblaciones policlonales de células T con diferentes especificidades de antígenos y avidesces. La amplitud del repertorio total de células T puede ser indicativa del número de epítomos accionables sobre las células tumorales.

Figura 82: muestra un diagrama de una forma de realización del procedimiento 2A, un procedimiento de 22 días para la fabricación de TIL.
50

Figura 83: Tabla comparativa de las etapas A a F de las formas de realización ejemplares del procedimiento 1C y el procedimiento 2A.

Figura 84: Comparación detallada de una forma de realización del procedimiento 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

55 Figura 85: Esquema detallado de una forma de realización de un procedimiento de terapia TIL.

Figuras 86A-86C: Caracterización fenotípica de productos TIL usando un ensayo de citometría de flujo de 10 colores. (A) El porcentaje de subconjuntos de células T y no células T se define por CD45⁺CD3⁺ y CD45⁻ (no linfocitos) /CD45⁺CD3⁻ (linfocitos de células no T), respectivamente. En general, > 99% de los productos TIL probados consistieron en células T (CD45⁺CD3⁺). Se muestra un promedio de productos TIL (n=10). (B) Porcentaje de dos subconjuntos de células T que incluyen CD45⁺CD3⁺CD8⁺ (círculo abierto azul) y CD45⁺CD3⁺CD4⁺ (círculo abierto rosa). No se observa ninguna diferencia estadística en el porcentaje de ambos subconjuntos utilizando la prueba T para datos no apareados de Student (P=0.68). (C) La población que no es de células T se caracterizó para cuatro subconjuntos diferentes que incluyen: 1) No linfocitos (CD45⁻), 2) Células NK (CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺), 3) Células B (CD45⁺CD19⁺) y 4) células no NK/B (CD45⁺CD3⁻CD16⁻CD56⁻CD19⁻).

Figuras 87A-87B: Caracterización de subconjuntos de células T en poblaciones de células CD45⁺CD3⁺CD4⁺ y CD45⁺CD3⁺CD8⁺. Los subconjuntos de células T naive, de memoria central (TCM), de memoria efectora (TEF) y de memoria efectora RA+(EMRA) se definieron utilizando CD45RA y CCR7. Las figuras muestran subconjuntos de células T representativos de 10 productos TIL finales en poblaciones de células CD4⁺ (A) y de células CD8⁺ (B). El subconjunto de células T de memoria efectora (círculo azul abierto) es una población importante (>93%) en los subconjuntos CD4⁺ y CD8⁺ del producto final TIL. Menos del 7% de las células de productos TIL es un subconjunto de memoria central (círculo rosado abierto). Los subconjuntos EMRA (círculo gris abierto) y naive (círculo negro abierto) apenas se detectan en el producto TIL (<0.02%). Los valores p representan la diferencia entre EM y CM utilizando la prueba T para datos no apareados de Student

Figuras 88A-88B: detección de la expresión de MCSP y EpCAM en células tumorales de melanoma. Las líneas celulares de tumor de melanoma (WM35, 526 y 888), las líneas celulares de melanoma derivadas del paciente (1028, 1032 y 1041) y una línea celular de carcinoma de adenoma colorrectal (HT29 como control negativo) se caracterizaron mediante tinción para MCSP (proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma) y marcadores EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales). (A) El promedio del 90% de las células tumorales de melanoma expresan MCSP. (B) La expresión de EpCAM no se detectó en líneas de células tumorales de melanoma en comparación con el control positivo HT29, una línea de células tumorales EpCAM⁺.

Figuras 89A-89B: Detección de controles enriquecidos para la determinación de la precisión de detección de tumores. El ensayo se realizó agregando cantidades conocidas de células tumorales a suspensiones de PBMC (n=10). Se diluyeron células tumorales de melanoma MCSP+526 en relaciones de 1:10, 1:100 y 1:1000, luego se mezclaron con PBMC y se tificaron con anticuerpos anti-MCSP y anti-CD45 y colorante vivo/muerto y se analizaron por citometría de flujo. (A) Se detectaron aproximadamente 3000, 300 y 30 células en la dilución de 1:10, 1: 100 y 1: 1000, respectivamente. (B) Se utilizó un promedio (AV) y una desviación estándar (DE) de las células adquiridas en cada condición para definir los límites de referencia superior e inferior.

Figuras 90A-90B: Estudio de repetibilidad de los límites superior e inferior en controles enriquecidos. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado para determinar la repetibilidad del ensayo de adición. (A) El número de células tumorales detectadas por MCSP⁺ estaba de modo consistente dentro del rango de los límites de referencia superior e inferior. (B) El gráfico de regresión lineal demuestra la correlación entre las células MCSP⁺ y las diluciones de adición ($R^2=0.99$) con la línea sólida negra que muestra el mejor ajuste. Las líneas discontinuas verdes y grises representan los límites de predicción del 95% en la curva estándar y las muestras (Exp#1 a 3), respectivamente.

Figuras 91A-91B: Detección de tumor de melanoma residual en productos TIL. Los productos TIL se evaluaron para determinar la contaminación residual del tumor usando el ensayo desarrollado (n=15). (A y B) La mediana del número y el porcentaje de eventos MCSP⁺ detectables fue 2 y 0.0002%, respectivamente.

Figura 92: Evaluación de la potencia de los productos TIL después de la activación de las células T. Secreción de IPN γ después de la reestimulación con anti-CD3/CD28/CD137 en productos TIL evaluados por ELISA por duplicado (n=5). La secreción de IPN γ por parte de los productos TIL fue significativamente mayor que los controles no estimulados usando la prueba de grado con signo de Wilcoxon (P = 0.02), y consistentemente > 1000 pg/ml. La secreción de IPN γ > 200 pg/ml se considera potente, el valor de p <0.05 se considera estadísticamente significativo.

Figura 93: Representación de una forma de realización de un procedimiento de fabricación de TIL criopreservado (22 días).

Figura 94: Tabla de mejoras de procedimientos de Gen 1 a Gen 2.

Figuras 95A-95C: células viables totales, tasa de crecimiento y viabilidad. El día 22, el producto celular de volumen reducido se agrupa y se toman muestras para determinar el rendimiento del cultivo antes de lavado y formulación. (A) Las muestras se analizan en el contador de células automatizado NC-200 como se describió anteriormente. La densidad de células viables total se determina mediante la gran media de recuentos duplicados de 4 muestras independientes. El procedimiento de Gen 2 produce un producto TIL de dosis similar a Gen 1 (media de Gen 1 = $4.10 \times 10^{10} \pm 2.8 \times 10^{10}$, media de Gen 2 = $4.12 \times 10^{10} \pm 2.5 \times 10^{10}$). (B) La tasa de

crecimiento se calcula para la fase REP como $gr = \ln(N(t)/N(0))/t$. (C) La viabilidad celular se evaluó a partir de 9 lotes de desarrollo de procedimientos utilizando el Cellometer K2 como se describió anteriormente. No se observó una disminución significativa en la viabilidad celular después de un único ciclo de congelación-descongelación del producto formulado. El promedio de reducción de la viabilidad tras el deshielo y el muestreo es del 2.19%.

Figuras 96A-96C: Los productos Gen 2 son cultivos de células T altamente puros que expresan moléculas coestimuladoras a niveles comparables a los de Gen 1. (A) Se ensayó la identidad de productos farmacéuticos recién formulados mediante citometría de flujo para su liberación. Los procedimientos de Gen 1 y Gen 2 producen cultivos de células T de alta pureza según lo definido por el fenotipo CD45+, CD3+ (doble positivo). (B & C) Se descongelaron viales satélites crioconservados de producto farmacéutico formulado y se ensayó el fenotipo extendido mediante citometría de flujo como se describió previamente. Los productos Gen 1 y Gen 2 expresan niveles similares de moléculas coestimuladoras CD27 y CD28 en subconjuntos de células T. Se requieren moléculas coestimuladoras tales como CD27 y CD28 para suministrar la señalización secundaria y terciaria necesaria para la proliferación de células efectoras en el acoplamiento del receptor de células T. El valor de p se calculó utilizando la prueba 't' de Mann-Whitney.

Figura 97: Los productos Gen 2 exhiben longitudes de telómero similares. Sin embargo, algunas poblaciones de TIL pueden tender hacia un telómero relativo más largo.

Figura 98: Los productos farmacológicos Gen 2 secretan IPN γ en respuesta al acoplamiento de CD3, CD28 y CD137.

Figuras 99A-99B: diversidad de receptores de células T. (A) Se indexaron secuencias de CDR3 únicas en relación con la frecuencia en cada producto para producir una clasificación representativa de la diversidad general de receptores de células T en el producto. (B) El número total promedio de secuencias de CDR3 únicas presentes en cada producto de infusión.

Figura 100: una forma de realización de un procedimiento de fabricación de TIL de la presente invención.

Figura 101: Mejora de la expansión durante el pre-REP con IL-2/IL-15/IL-21 en múltiples histologías tumorales.

Figuras 102A-102B: IL-2/IL-15/IL-21 aumentó el porcentaje de células CD8+ en el carcinoma de pulmón, pero no en el melanoma. TIL derivado de (A) melanoma (n=4), y (B) pulmón (n=7) fueron evaluados fenotípicamente para células CD4+ y CD8+ usando citometría de flujo post pre-REP.

Figuras 103A-103B: la expresión de CD27 se incrementó ligeramente en células CD8+ en cultivos tratados con IL-2/IL-15/IL-21. TIL derivado de (A) melanoma (n=4) y (B) pulmón (n=7) se evaluaron fenotípicamente para CD27+ y CD28+ en las células CD4+ y CD8+ usando citometría de flujo post pre-REP.

Figuras 104A-104B: los subconjuntos de células T no se modificaron con la adición de IL-15/IL-21. Los TIL se evaluaron fenotípicamente para los subconjuntos efector/de memoria (CD45RA y CCR7) en las células CD8+ y CD4+ (datos no mostrados) de (A) melanoma (n=4) y (B) pulmón (n=8) mediante citometría de flujo pos-pre-REP.

Figuras 105A-105C: La capacidad funcional de TIL se mejoró diferencialmente con IL-2/IL-15/IL-21. Se evaluó la expresión de CD107a+ de TIL derivada de (A) melanoma (n=4) y (B) pulmón (n=5) en respuesta a la estimulación de PMA durante 4 horas en las células CD4+ y CD8+, mediante citometría de flujo. (C) Pre-REP TIL derivado de melanoma y pulmón se estimularon durante 24 horas con anticuerpo anti-CD3 soluble y los sobrenadantes se evaluaron para IPN γ mediante ELISA.

Figuras 106A-106B: Se evaluó el repertorio de TCR $\gamma\beta$ (24 especificidades) en el TIL derivado de un (A) melanoma y (B) tumor de pulmón usando el kit Beckman Coulter para citometría de flujo.

Figura 107: Esquema del procedimiento de fabricación de LN-144 crioconservado Gen 2.

Figura 108: Esquema del diseño del estudio de un ensayo clínico multicéntrico de fase 2 de nuevos TIL crioconservados administrados a pacientes con melanoma metastásico.

Figura 109: Tabla que ilustra la comparación de las características de los pacientes de la cohorte 1 (ASCO 2017) frente a la cohorte 2.

Figura 110: Tabla que ilustra los eventos adversos emergentes del tratamiento ($\geq 30\%$).

Figura 111: Eficacia del producto de infusión y la terapia TIL.

Figura 112: Estado clínico de respuesta evaluable de los pacientes con SD o mejor respuesta.

Figura 113: Cambio porcentual en la suma de diámetros.

Figura 114: Se observó un aumento del nivel de HMGB 1 con el tratamiento con TIL.

Figura 115: Se observó un aumento en el biomarcador IL-10 después de la infusión de LN-144.

Figura 116: Características actualizadas de los pacientes para la Cohorte 2 del ensayo clínico de fase 2 en melanoma metastásico del segundo corte de datos (N=17 pacientes).

5 Figura 117: Eventos adversos emergentes del tratamiento para la cohorte 2 ($\geq 30\%$) del segundo corte de datos (N=17 pacientes).

Figura 118: Tiempo de respuesta para pacientes evaluables (enfermedad estable o mejor) en la Cohorte 2 desde el segundo corte de datos (N=17 pacientes). De los 10 pacientes en el conjunto de eficacia, un paciente (Paciente 10) no fue evaluable debido a una muerte relacionada con el melanoma antes de la primera evaluación del tumor no representada en la figura.

Figura 119: Datos de eficacia actualizados para la cohorte 2 del segundo corte de datos (N=17 pacientes). El número medio de TIL infundidos es 34×10^9 . La mediana del número de terapias previas fue de 4:5. Los pacientes con una mutación BRAF respondieron tan bien como los pacientes con BRAF de tipo silvestre (* se refiere a pacientes con una mutación BRAF). Un paciente (Paciente 10) no fue evaluable debido a una muerte relacionada con el melanoma antes de la primera evaluación del tumor, pero aún se consideró en el conjunto de eficacia. Abreviaturas: RP, respuesta parcial; SD: enfermedad estable; EP, enfermedad progresiva.

Figura 120: Datos de eficacia actualizados para pacientes evaluables de la Cohorte 2 del segundo corte de datos (N=17 pacientes). El * indica un paciente no evaluable que no alcanzó la primera evaluación. Todos los pacientes evaluables en cuanto a eficacia habían recibido terapias previas con inhibidores de puntos de control anti-PD-1 y anti-CTLA-4.

Figura 121: Tomografía computarizada representativa de un paciente (003-015) con un RP de la cohorte 2, segundo corte de datos.

Figura 122: Correlación de la inducción de IFN- γ por el producto TIL antes de la infusión con la reducción clínica del tamaño del tumor el día 42 después de la infusión de TIL.

25 Figura 123: Niveles de IP-10 (CXCL10) (pg/mL, $\log_{10}$) antes y después de la infusión de una forma de realización del producto Gen 2 TIL. IP-10 es un marcador de adhesión celular y dirigido.

Figura 124: Niveles de IP-10 (CXCL10) (pg/mL, $\log_{10}$) antes y después de la infusión de una forma de realización del producto Gen 1 TIL.

Figura 125: Niveles de MCP-1 (pg/mL, $\log_{10}$) antes y después de la infusión de una forma de realización del producto Gen 2 TIL. MCP-1 es un marcador de adhesión celular y dirigido.

Figura 126: Niveles de MCP-1 (pg/mL, $\log_{10}$) antes y después de la infusión de una forma de realización del producto Gen 1 TIL.

Figura 127: Datos de estudios de fase 2 en carcinoma de cuello uterino y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). SD=enfermedad estable. PR=enfermedad progresiva. PR=respuesta parcial.

35 Breve descripción del listado de secuencias

La SEQ ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de muromonab.

La SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de muromonab.

La SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-2 humana recombinante.

La SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de la aldesleucina.

40 La SEQ ID NO:5 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-4 humana recombinante.

La SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-7 humana recombinante.

La SEQ ID NO:7 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-15 humana recombinante.

La SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-21 humana recombinante.

Descripción detallada de la invención

45 I. Introducción

La terapia celular adoptiva que utiliza TIL cultivados ex vivo mediante el Protocolo de expansión rápida (REP) ha producido una terapia celular adoptiva exitosa después de la inmunosupresión del huésped en pacientes con melanoma. Los parámetros actuales de aceptación de la infusión se basan en lecturas de la composición de los TIL (por ejemplo, positividad para CD28, CD8 o CD4) y en los múltiples numéricos de expansión y viabilidad del producto REP.

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

Los trabajos anteriores informan que es deseable limitar la glucólisis y promover el metabolismo mitocondrial en los TIL antes de la transferencia, ya que las células que dependen en gran medida de la glucólisis sufrirán privación de nutrientes tras la transferencia adoptiva, lo que da como resultado la muerte de la mayoría de las células transferidas. Por tanto, la técnica enseña que la promoción del metabolismo mitocondrial podría promover la longevidad in vivo y, de hecho, sugiere el uso de inhibidores de la glucólisis antes de la inducción de la respuesta inmune. Véase Chang et al. (Chang et al., Nat. Immunol. 2016, 17(364).

Se divulgan en el presente documento, aunque no se reivindican, procedimientos para evaluar y cuantificar este aumento en la salud metabólica. Por lo tanto, se divulgan en el presente documento, aunque no se reivindican, procedimientos para analizar la salud relativa de una población de TIL utilizando una o más evaluaciones generales del metabolismo, que incluyen, entre otras, tasas y cantidades de glucólisis, fosforilación oxidativa, capacidad respiratoria de reserva (SRC), y reserva glucolítica.

Además, también se divulgan en el presente documento, aunque no se reivindican, procedimientos para evaluar y cuantificar este aumento en la salud metabólica. Por lo tanto, se divulgan en el presente documento, pero no se reivindican, procedimientos para analizar la salud relativa de una población de TIL utilizando una o más evaluaciones generales del metabolismo, que incluyen, entre otras, tasas y cantidades de glucólisis, fosforilación oxidativa, capacidad respiratoria de reserva (SRC), y reserva glucolítica.

Además, las evaluaciones adicionales opcionales incluyen, pero no se limitan a, producción de ATP, masa mitocondrial y absorción de glucosa.

II. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

El término "in vivo" se refiere a un evento que tiene lugar en el cuerpo de un sujeto.

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

El término "ex vivo" se refiere a un evento que implica tratar o realizar un procedimiento en una célula, tejido y/u órgano que se ha eliminado del cuerpo de un sujeto. Acertadamente, la célula, tejido y/u órgano pueden devolverse al cuerpo del sujeto en un procedimiento de cirugía o tratamiento.

El término "expansión rápida" significa un aumento en el número de TIL específicos de antígeno de al menos aproximadamente 3 veces (o 4, 5, 6, 7, 8 o 9 veces) por un período de una semana, más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces (o 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 veces) por un período de una semana, o lo más preferiblemente al menos aproximadamente 100 veces por un período de una semana. A continuación se describen varios protocolos de expansión rápida.

Por "linfocitos que se infiltran en el tumor" o "TIL" en el presente documento 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, pero no se limitan a, células T citotóxicas CD8⁺ (linfocitos), células T Th1 y Th17 CD4⁺, células asesinas naturales, células dendríticas y macrófagos M1. Los TIL incluyen tanto los TIL primarios como los secundarios. Los "TIL primarios" son aquellos que se obtienen de muestras de tejido del paciente como se describe en este documento (a veces denominado "recién recolectado"), y los "TIL secundarios" son cualquier población de células TIL que se han expandido o proliferado como se discute en este documento, incluyendo, pero no limitado a TIL a granel y TIL expandidos ("REP TIL" o "post-REP TIL"). Las poblaciones de células TIL pueden incluir TIL modificadas genéticamente.

Por "población de células" (incluidas las TIL) en el presente documento se entiende un número de células que comparten rasgos comunes. En general, las poblaciones varían generalmente de 1×10^6 a 1×10^{10} en número, con diferentes poblaciones de TIL que comprenden diferentes números. Por ejemplo, el crecimiento inicial de TIL primarios en presencia de IL-2 da como resultado una población de TIL a granel de aproximadamente 1×10^8 células. La expansión de REP se realiza generalmente para proporcionar poblaciones de 1.5×10^9 a 1.5×10^{10} células para infusión.

Por "TIL criopreservados" en el presente documento se entiende que los TIL, primarios, a granel o expandidos (REP TIL), se tratan y almacenan en el intervalo de aproximadamente -150°C a -60°C . Los procedimientos generales para la criopreservación también se describen en otra parte de este documento, incluidos los Ejemplos. Para mayor claridad, los "TIL criopreservados" se distinguen de las muestras de tejido congeladas que pueden usarse como fuente de TIL primarios.

Por "TIL descongelados criopreservados" en el presente documento se entiende una población de TIL que se criopreservó previamente y luego se trató para volver a temperatura ambiente o superior, incluidas, entre otras, temperaturas de cultivo celular o temperaturas en las que se pueden administrar TIL a un paciente.

Los TIL generalmente se pueden definir bioquímicamente, usando marcadores de superficie celular, o funcionalmente, por su capacidad para infiltrar tumores y efectuar el tratamiento. Los TIL generalmente se pueden clasificar expresando 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 infiltrar tumores sólidos tras la reintroducción en un paciente.

El término "medios de criopreservación" o "medio de criopreservación" se refiere a cualquier medio que pueda usarse para la criopreservación de células. Dichos medios pueden incluir medios que comprenden del 7% al 10% de DMSO. Los medios ejemplares incluyen CryoStor CS10, Hyperthermasol, así como combinaciones de los mismos. El término "CS10" se refiere a un medio de criopreservación que se obtiene de Stemcell Technologies o de Bioline Solutions. El medio CS10 puede denominarse con el nombre comercial "CryoStor® CS10". El medio CS10 es un medio libre de componentes animales y sin suero que comprende DMSO.

El término "célula T de memoria central" se refiere a un subconjunto de células T que en el ser humano son CD45RO+ y expresan constitutivamente CCR7 (CCR7^{hi}) y CD62L (CD62L^{hi}). El fenotipo de superficie de las células T de memoria central también incluye TCR, CD3, CD127 (IL-7R) e IL-15R. Los factores de transcripción para las células T de memoria central incluyen BCL-6, BCL-6B, MBD2 e BMI1. Las células T de memoria central secretan principalmente IL-2 y CD40L como moléculas efectoras después de la activación del TCR. Los linfocitos T de memoria central predominan en el compartimento CD4 de la sangre, y en el ser humano están proporcionalmente enriquecidos en los ganglios linfáticos y las amígdalas.

El término "célula T de memoria efectora" se refiere a un subconjunto de células T humanas o de mamífero que, como las células T de memoria central, son CD45RO+, pero han perdido la expresión constitutiva de CCR7 (CCR7^{lo}) y son heterogéneas o bajas para la expresión de CD62L (CD62L^{lo}). El fenotipo de superficie de las células T de memoria central también incluye TCR, CD3, CD127 (IL-7R) e IL-15R. Los factores de transcripción para las células T de memoria central incluyen BLIMP1. Las células T de memoria efectora secretan rápidamente altos niveles de citocinas inflamatorias después de la estimulación antigénica, que incluyen interferón- γ , IL-4 e IL-5. Las células T de memoria efectora predominan en el compartimento CD8 de la sangre y, en el ser humano, se enriquecen proporcionalmente en los pulmones, el hígado y el intestino. Las células T de memoria efectora CD8+ transportan grandes cantidades de perforina.

El término "sistema cerrado" se refiere a un sistema que está cerrado al entorno exterior. Se puede emplear cualquier sistema cerrado apropiado para procedimientos de cultivo celular con los procedimientos de la presente invención. Los sistemas cerrados incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a contenedores G cerrados. Una vez que se agrega un segmento tumoral al sistema cerrado, el sistema no se abre al ambiente exterior hasta que los TIL estén listos para ser administrados al paciente.

Los términos "fragmentación", "fragmento" y "fragmentado", como se usan en el presente documento para describir procedimientos para afectar un tumor, incluyen procedimientos de fragmentación mecánica tales como triturar, cortar, dividir y morcelar tejido tumoral, así como cualquier otro procedimiento para alterar la estructura física del tejido tumoral.

Los términos "células mononucleares de sangre periférica" y "PBMC" se refieren a una célula de sangre periférica que tiene un núcleo redondo, que incluye linfocitos (células T, células B, células NK) y monocitos. Preferiblemente, las células mononucleares de sangre periférica son células mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas. Las PBMC son un tipo de célula presentadora de antígenos.

El término "anticuerpo anti-CD3" se refiere a un anticuerpo o una variante del mismo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal y que incluye anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o murinos que se dirigen contra el receptor CD3 en el receptor del antígeno de células T de células T maduras. Los anticuerpos anti-CD3 incluyen OKT-3, también conocido como muromonab. Los anticuerpos anti-CD3 también incluyen el clon UHCT1,

también conocido como T3 y CD3ε. Otros anticuerpos anti-CD3 incluyen, por ejemplo, oteixizumab, teplizumab y visilizumab.

El término "OKT-3" (también denominado en el presente documento "OKT3") se refiere a un anticuerpo monoclonal o biosimilar o variante del mismo, incluidos anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o murinos, dirigidos contra el receptor CD3 en el receptor de antígeno de célula T de células T maduras, e incluye formas disponibles comercialmente como OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 pure, Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA) y muromonab o variantes, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicoformas o biosimilares de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de muromonab se dan en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2). Un hibridoma capaz de producir OKT-3 se deposita en la Colección Americana de Cultivos Tipo y se le asigna el número de acceso ATCC CRL 8001. Un hibridoma capaz de producir OKT-3 también se deposita en la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC) y se le asigna el número de catálogo 86022706.

TABLA 1. Secuencias de aminoácidos de muromonab.

Identificador	Secuencia (símbolos de aminoácido de una letra)
SEQ ID NO:1	<pre> QVQLQESGGGLVQPGGGLQ KQNPFRKATL TQRLKSTAY NLGSLTIEDG GAVYDAAAY GGGVSLDPSG GGGTITVAAA 100 KLTAEVDFPL AAVICGQDGS GATIGGQDNGG STGFNVTDA KGGGLGSGGG TGGAGQGGEL 150 KLTAEVDFPL STGFNVTDA STGFNVTDA KLTAEVDFPL KLTAEVDFPL KLTAEVDFPL 200 STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 250 STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 300 STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 350 STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 400 STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 450 </pre>
SEQ ID NO:2	<pre> QVLTQSPATL MSLSPGQPMR NTLSSGQDGS TGGNQLGSGG TGFNVTDA STGFNVTDA 50 STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 100 STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 150 STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 200 </pre>

El término "IL-2" (también denominado en el presente documento como "IL2") se refiere al factor de crecimiento de células T conocido como interleucina-2, e incluye todas las formas de IL-2, incluidas las formas humanas y de mamíferos, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicoformas, biosimilares y variantes de los mismos. La IL-2 se describe, por ejemplo, en Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88 and Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79. La secuencia de aminoácidos de IL-2 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:3). Por ejemplo, el término IL-2 abarca formas humanas recombinantes de IL-2 como la aldesleucina (PROLEUKIN, disponible comercialmente en múltiples proveedores en 22 millones de UI por viales de un solo uso), así como la forma de IL-2 recombinante suministrada comercialmente por CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) o ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-209-b) y otros equivalentes comerciales de otros proveedores. La aldesleucina (desalanil-1, serina-125 IL-2 humana) es una forma recombinante humana no glicosilada de IL-2 con un peso molecular de aproximadamente 15 kDa. La secuencia de aminoácidos de la aldesleucina adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:4). El término IL-2 también abarca formas pegiladas de IL-2, como se describe en el presente documento, incluido el profármaco de IL2 pegilado NKTR-214, disponible en Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA. La NKTR-214 y la IL-2 pegilada adecuadas para su uso en la invención se describen en la publicación de solicitud de patente estadounidense No. US 2014/0328791 A1 y la publicación de solicitud de patente internacional No. WO 2012/065086 A1. Las formas alternativas de IL-2 conjugada adecuadas para su uso en la invención se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4,766,106, 5,206,344, 5,089,261 y 4,902,502. Las formulaciones de IL-2 adecuadas para su uso en la invención se describen en la patente de EE.UU. No. 6,706,289.

TABLA 2. Secuencias de aminoácidos de interleucinas.

Identificador	Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO:3	<pre> MAVTASSTP TQQLKSTEDL QGSLKLTIEDG GAVYDAAAY GGGVSLDPSG GGGTITVAAA 50 KLTAEVDFPL AAVICGQDGS GATIGGQDNGG STGFNVTDA KGGGLGSGGG TGGAGQGGEL 100 KLTAEVDFPL STGFNVTDA STGFNVTDA KLTAEVDFPL KLTAEVDFPL KLTAEVDFPL 150 </pre>
IL-2 recombinante humana (rhIL-2)	
SEQ ID NO:4	<pre> STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 50 STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 100 STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA STGFNVTDA 150 </pre>
Aldelesleucina	

SEQ ID NO:5	
IL-4 recombinante humana (rhIL-4)	<pre> MSKSLTQSP LSTFNNLAK QNTATSLY TLKAKPSTL TSTSTPRA TLKQPKKH RNTSLQST AQSTPSTQ TPTNNLQK NQSLNNGQ PKKSTPSTL NPLSTNTI KPKSTPRA </pre>
SEQ ID NO:6	
IL-7 recombinante humana (rhIL-7)	<pre> MSKSLTQSP LSTFNNLAK QNTATSLY TLKAKPSTL TSTSTPRA TLKQPKKH RNTSLQST AQSTPSTQ TPTNNLQK NQSLNNGQ PKKSTPSTL NPLSTNTI KPKSTPRA </pre>
SEQ ID NO:7	
IL-15 recombinante humana (rhIL-15)	<pre> MSKSLTQSP LSTFNNLAK QNTATSLY TLKAKPSTL TSTSTPRA TLKQPKKH RNTSLQST AQSTPSTQ TPTNNLQK NQSLNNGQ PKKSTPSTL NPLSTNTI KPKSTPRA </pre>
SEQ ID NO:8	
IL-21 recombinante humana (rhIL-21)	<pre> MSKSLTQSP LSTFNNLAK QNTATSLY TLKAKPSTL TSTSTPRA TLKQPKKH RNTSLQST AQSTPSTQ TPTNNLQK NQSLNNGQ PKKSTPSTL NPLSTNTI KPKSTPRA </pre>

El término "IL-4" (también denominado en el presente documento "IL4") se refiere a la citocina conocida como interleucina 4, que es producida por células T Th2 y por eosinófilos, basófilos y mastocitos. IL-4 regula la diferenciación de células T colaboradoras naive (células Th0) a células T Th2. Steinke y Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70. Tras la activación por IL-4, las células T Th2 producen posteriormente IL-4 adicional en un circuito de retroalimentación positiva. IL-4 también estimula la proliferación de células B y la expresión del MHC de clase II e induce el cambio de clase a la expresión de IgE e IgG₁ de las células B. La IL-4 humana recombinante adecuada para su uso en la invención está disponible comercialmente por múltiples proveedores, incluidos ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (Cat. No. CYT-211) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína recombinante IL-15 humana, cat. No. Gibco CTP0043). La secuencia de aminoácidos de IL-4 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:5).

El término "IL-7" (también denominado en el presente documento "IL7") se refiere a una citocina derivada de tejido glicosilada conocida como interleucina 7, que puede obtenerse de células estromales y epiteliales, así como de células dendríticas. Fry y Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904. IL-7 puede estimular el desarrollo de células T. La IL-7 se une al receptor de IL-7, un heterodímero formado por el receptor alfa de IL-7 y el receptor de cadena gamma común, que en una serie de señales importantes para el desarrollo de las células T dentro del timo y la supervivencia dentro de la periferia. La IL-7 humana recombinante adecuada para su uso en la invención está disponible comercialmente por múltiples proveedores, incluidos ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (Cat. No. CYT-254) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína recombinante IL-15 humana, No. de cat. Gibco PHC0071). La secuencia de aminoácidos de IL-7 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:6).

El término "IL-15" (también denominado en el presente documento como "IL15") se refiere al factor de crecimiento de células T conocido como interleucina-15, e incluye todas las formas de IL-2, incluidas las formas humanas y de mamíferos, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicofomas, biosimilares y variantes de los mismos. La IL-15 se describe, por ejemplo, en Fehniger y Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32. IL-15 comparte subunidades de receptores de señalización β y γ con IL-2. La IL-15 humana recombinante es una cadena polipeptídica única no glicosilada que contiene 114 aminoácidos (y una metionina N-terminal) con una masa molecular de 12.8 kDa. La IL-15 humana recombinante está disponible comercialmente por múltiples proveedores, incluidos ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (Cat. No. CYT-230-b) and ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína recombinante IL-15 humana, No. de catálogo 34-8159-82). La secuencia de aminoácidos de IL-15 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:7).

El término "IL-21" (también denominado en el presente documento "IL21") se refiere a la proteína citocina pleiotrópica conocida como interleucina-21, e incluye todas las formas de IL-21, incluidas las formas humanas y de mamíferos, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicofomas, biosimilares y variantes de los mismos. IL-21 se describe, por ejemplo, en Spolski y Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95. La IL-21 es producida principalmente por células T asesinas naturales y células T CD4⁺ humanas activadas. La IL-21 humana recombinante es una cadena polipeptídica única no glicosilada que contiene 132 aminoácidos con una masa molecular de 15.4 kDa. La IL-21 humana recombinante está disponible comercialmente por múltiples proveedores, incluidos ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (Cat. No. CYT-408-b) and ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína recombinante IL-21 humana, No. de cat. 14-8219-80). La secuencia de aminoácidos de IL-21 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:8).

Cuando se indica "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz inhibidora de tumores" o "cantidad terapéutica", un médico puede determinar la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y estado del paciente (sujeto). En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos que infiltran el tumor (por ejemplo, TIL secundarios o linfocitos citotóxicos modificados genéticamente) descrita en el presente documento puede administrarse en una dosis de 10^4 a 10^{11} células/kg de peso corporal (por ejemplo, 10^5 a 10^6 , 10^5 a 10^{10} , 10^5 a 10^{11} , 10^6 a 10^{10} , 10^6 a 10^{11} , 10^7 a 10^{11} , 10^7 a 10^{10} , 10^8 a 10^{11} , 10^8 a 10^{10} , 10^9 a 10^{11} , o 10^9 a 10^{10} células/kg de peso corporal), incluidos todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de linfocitos infiltrantes de tumores (incluidos en algunos casos, linfocitos citotóxicos modificados genéticamente) también se pueden administrar múltiples veces a estas dosis. Los linfocitos que infiltran el tumor (incluidos en algunos casos, genéticamente) pueden administrarse usando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Un experto en la técnica de la medicina puede determinar fácilmente la dosificación y el régimen de tratamiento óptimos para un paciente en particular controlando al paciente para detectar signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

El término "malignidad hematológica" se refiere a cánceres de mamíferos y tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides, que incluyen, pero no se limitan a tejidos de la sangre, médula ósea, ganglios linfáticos y sistema linfático. Las neoplasias malignas hematológicas también se denominan "tumores líquidos". Las neoplasias malignas hematológicas incluyen, entre otras, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma linfocítico crónico (LLC), linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia monocítica aguda (LMA), linfoma de Hodgkin y linfomas no Hodgkin. El término "neoplasia hematológica de células B" se refiere a neoplasias hematológicas que afectan a las células B.

El término "tumor sólido" se refiere a una masa anormal de tejido que normalmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. El término cáncer de tumor sólido se refiere a tumores sólidos malignos, neoplásicos o cancerosos. Los cánceres de tumor sólido incluyen, pero no se limitan a, sarcomas, carcinomas y linfomas, tales como cánceres de pulmón, mama, próstata, colon, recto, y vejiga. La estructura tisular de los tumores sólidos incluye compartimentos de tejido interdependientes que incluyen el parénquima (células cancerosas) y las células estromales de soporte en las que se dispersan las células cancerosas y que pueden proporcionar un microambiente de soporte.

El término "tumor líquido" se refiere a una masa anormal de células que es de naturaleza fluida. Los cánceres de tumores líquidos incluyen, pero no se limitan a, leucemias, mielomas y linfomas, así como otras neoplasias malignas hematológicas. Los TIL obtenidos de tumores líquidos también pueden denominarse en el presente documento linfocitos infiltrantes de médula (MIL).

El término "microambiente", como se usa en este documento, puede referirse al microambiente tumoral sólido o hematológico como un todo o a un subconjunto individual de células dentro del microambiente. El microambiente tumoral, como se usa en este documento, se refiere a una mezcla compleja de "células, factores solubles, moléculas de señalización, matrices extracelulares y señales mecánicas que promueven la transformación neoplásica, apoyan el crecimiento e invasión tumoral, protegen el tumor de la inmunidad del huésped, fomentan la resistencia terapéutica y proporcionan nichos para que prosperen las metástasis dominantes", como se describe en Swartz, et al., Cancer Res., 2012, 72, 2473. Aunque los tumores expresan antígenos que deberían ser reconocidos por las células T, la eliminación del tumor por parte del sistema inmunológico es poco común debido a la inmunosupresión del microambiente.

También se describe en el presente documento pero no se reivindica un procedimiento para tratar un cáncer con una población de TIL, en donde un paciente se trata previamente con quimioterapia no mieloablativa antes de una infusión de TIL según la invención. Se puede proporcionar la población de TIL en la que un paciente se trata previamente con quimioterapia no mieloablativa antes de una infusión de TIL de acuerdo con la presente invención. La quimioterapia no mieloablativa es ciclofosfamida 60 mg/kg/d durante 2 días (días 27 y 26 antes de la infusión de TIL) y fludarabina 25 mg/m²/d durante 5 días (días 27 a 23 antes de la infusión de TIL). Después de la quimioterapia no mieloablativa y la infusión de TIL (en el día 0), el paciente puede recibir una infusión intravenosa de IL-2 por vía intravenosa a 720,000 UI/kg cada 8 horas hasta tolerancia fisiológica.

Los hallazgos experimentales indican que el agotamiento de linfocitos (linfodepleción) antes de la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de tumor desempeña un papel clave en la mejora de la eficacia del tratamiento al eliminar las células T reguladoras y los elementos competidores del sistema inmunológico ("sumideros de citocinas"). Por consiguiente, una etapa de linfodepleción (a veces también denominada "acondicionamiento inmunosupresor") en el paciente puede ser utilizada antes de la introducción de las rTIL de la invención.

Los términos "coadministración", "coadministrar", "administrado en combinación con", "administrar en combinación con", "simultáneo" y "concurrente", como se usan en este documento, abarcan la administración de dos o más ingredientes farmacéuticos activos (en una forma de realización preferida de la presente

invención, por ejemplo, al menos un agonista del canal de potasio en combinación con una pluralidad de TIL) a un sujeto de modo que ambos ingredientes farmacéuticos activos y/o sus metabolitos estén presentes en el sujeto al mismo tiempo. La coadministración incluye la administración simultánea en composiciones separadas, la administración en diferentes momentos en composiciones separadas o la administración en una composición en la que están presentes dos o más ingredientes farmacéuticos activos. Se prefiere la administración simultánea en composiciones separadas y la administración en una composición en la que están presentes ambos agentes.

El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto o combinación de compuestos como se describe en el presente documento que es suficiente para efectuar la aplicación pretendida que incluye, pero no se limita a, el tratamiento de enfermedades. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según la aplicación prevista (in vitro o in vivo), o el sujeto y la condición patológica que se está tratando (por ejemplo, el peso, la edad y el sexo del sujeto), la gravedad de la condición patológica, o la forma de administración. El término también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en las células diana (por ejemplo, la reducción de la adhesión plaquetaria y/o la migración celular). La dosis específica variará dependiendo de los compuestos particulares elegidos, el régimen de dosificación a seguir, si el compuesto se administra en combinación con otros compuestos, el momento de administración, el tejido al que se administra y el sistema de administración física en donde se transporta el compuesto.

Los términos "tratamiento", "tratar", "trato" y similares, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención completa o parcial de una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curación parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en este documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado con tenerla; (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. "Tratamiento" también pretende abarcar 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 inmune o conferir inmunidad en ausencia de una enfermedad, por ejemplo, en el caso de una vacuna.

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

Los términos "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad" y "porcentaje de identidad de secuencia" (o sinónimos de los mismos, por ejemplo, "99% idéntico") en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo espacios, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna sustitución conservadora de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir utilizando software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Se conocen en la técnica diversos algoritmos y software que pueden usarse para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Los programas adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia incluyen, por ejemplo, el conjunto de programas BLAST disponibles en el sitio web BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Gobierno de EE. UU. Las comparaciones entre dos secuencias se pueden realizar utilizando el algoritmo BLASTN o BLASTP. BLASTN se usa para comparar secuencias de ácidos nucleicos, mientras que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o MegAlign, disponibles en DNASTAR, son programas de software adicionales disponibles públicamente que pueden usarse para alinear secuencias. Un experto en la técnica puede determinar los parámetros apropiados para la alineación máxima mediante un software de alineación particular. En determinadas formas de realización, se utilizan los parámetros predeterminados del software de alineación.

Como se usa en este documento, el término "variante" abarca, pero no se limita a anticuerpos o proteínas de fusión que comprenden una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de referencia por medio de una o más sustituciones, delecciones y/o adiciones en ciertas posiciones dentro o adyacentes a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de referencia. La variante puede comprender una o más sustituciones conservadoras en su secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de referencia. Las sustituciones conservadoras pueden implicar, por ejemplo, la sustitución de aminoácidos cargados de manera similar o no cargados. La variante conserva la

capacidad de unirse específicamente al antígeno del anticuerpo de referencia. El término variante también incluye anticuerpos o proteínas pegilados.

Por "linfocitos infiltrantes de tumores" o "TIL" se entiende en la presente una población de células obtenidas originalmente como glóbulos blancos que han abandonado el torrente sanguíneo de un sujeto y migrado a un tumor. Los TIL incluyen, pero no se limitan a, células T citotóxicas CD8⁺ (linfocitos), células T Th1 y Th17 CD4⁺, células asesinas naturales, células dendríticas y macrófagos M1. Los TIL incluyen tanto los TIL primarios como los secundarios. Los "TIL primarios" son aquellos que se obtienen de muestras de tejido de pacientes como se describe en este documento (a veces denominadas "recién recolectadas"), y los "TIL secundarios" son cualquier población de células TIL que se hayan expandido o proliferado como se discute en la presente, que incluyen, pero no se limitan a TIL a granel, TIL expandidos ("REP TIL") así como "reREP TIL" como se discuten en el presente documento. Los reREP TIL pueden incluir, por ejemplo, TIL de segunda expansión o TIL de segunda expansión adicional (como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL).

Los TIL generalmente se pueden definir bioquímicamente, usando marcadores de superficie celular, o funcionalmente, por su capacidad para infiltrar tumores y efectuar el tratamiento. Los TIL generalmente se pueden clasificar expresando uno o más de los siguientes biomarcadores: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 y CD25. Además, y de forma alternativa, los TIL pueden definirse funcionalmente por su capacidad para infiltrar tumores sólidos tras la 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 que aproximadamente 50 pg/ml, mayor que aproximadamente 100 pg/ml, mayor que aproximadamente 150 pg/ml o superior a aproximadamente 200 pg/ml.

Los términos "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" pretenden incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción e ingredientes inertes. El uso de tales vehículos farmacéuticamente aceptables o excipientes farmacéuticamente aceptables para ingredientes farmacéuticos activos es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable convencional sea incompatible con el ingrediente farmacéutico activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas de la invención. También se pueden incorporar a las composiciones y procedimientos descritos ingredientes farmacéuticos activos adicionales, tales como otros medicamentos.

Los términos "alrededor de" y "aproximadamente" significan que están dentro de un rango estadísticamente significativo de un valor. Tal intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro del 50%, más preferiblemente dentro del 20%, más preferiblemente todavía dentro del 10%, e incluso más preferiblemente dentro del 5% de un valor o intervalo dado. La variación permisible abarcada por los términos "alrededor de" o "aproximadamente" depende del sistema particular en estudio y puede ser fácilmente apreciada por un experto en la técnica. Además, como se usa en este documento, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" significan que las dimensiones, tamaños, formulaciones, parámetros, formas y otras cantidades y características no son y no necesitan ser exactos, pero pueden ser aproximados y/o mayores o menores, según se desee, reflejando tolerancias, factores de conversión, redondeo, error de medición y similares, y otros factores conocidos por los expertos en la técnica. En general, una dimensión, tamaño, formulación, parámetro, forma u otra cantidad o característica es "aproximada" si se indica expresamente o no que sea así. Se observa que las formas de realización de tamaños, formas y dimensiones muy diferentes pueden emplear las disposiciones descritas.

Los términos transitorios "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en", cuando se usan en las reivindicaciones adjuntas, en forma original y enmendada, definen el alcance de la reivindicación con respecto a los elementos o etapas adicionales de la reivindicación no citados, si los hubiera, están excluidos del alcance de la (s) reivindicación (es). El término "que comprende" pretende ser inclusivo o ilimitado y no excluye ningún elemento, procedimiento, etapa o material adicional no mencionado. El término "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o material que no sean los especificados en la reivindicación y, en este último caso, las impurezas ordinarias asociadas con el o los materiales especificados. El término "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a elementos, etapas o material(es) especificados y aquellos que no afecten materialmente a las características básicas y nuevas de la invención reivindicada. En formas de realización alternativas, todas las composiciones, procedimientos y kits descritos en el presente documento pueden definirse más específicamente mediante cualquiera de los términos de transición "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en".

III. Procedimientos de fabricación de TIL

Un ejemplo de procedimiento de TIL conocido como procedimiento 2A que contiene algunas de estas características se representa en la Figura 1, y algunas de las ventajas de esta forma de realización de la presente invención sobre el procedimiento 1C se describen en la Figura 2, al igual que la Figura 84. El procedimiento 1C se muestra a modo de comparación en la Figura 3. En la Figura 4 (recuentos de células más

altos) y en la Figura 5 (recuentos de células más bajos) se muestran dos líneas de tiempo alternativas para la terapia TIL basadas en el procedimiento 2A. En la Figura 6 y en la Figura 27 se muestra una forma de realización del procedimiento 2A. Las figuras 83 y 84 proporcionan además un procedimiento 2A ejemplar en comparación con un procedimiento 1C ejemplar.

- 5 Tal como se discute en el presente documento, la presente invención puede incluir una etapa relacionada con la reestimulación de TIL criopreservados para aumentar su actividad metabólica y, por tanto, su salud relativa antes del trasplante en un paciente, y procedimientos para probar dicha salud metabólica. Como se describe en general en el presente documento, los TIL generalmente se toman de una muestra de paciente y se manipulan para expandir su número antes del trasplante a un paciente. En algunas formas de realización, los
- 10 TIL pueden manipularse genéticamente opcionalmente como se discute a continuación.

En algunas formas de realización, los TIL se pueden criopreservar. Una vez descongelados, también pueden reestimularse para aumentar su metabolismo antes de la infusión a un paciente.

- La primera expansión (incluidos los procedimientos denominados preREP, así como los procedimientos que se muestran en la Figura 27 como Etapa A) se puede acortar a 3 a 14 días y la segunda expansión (incluidos
- 15 los procedimientos denominados REP, así como los procedimientos que se muestran en la Figura 27 como Etapa B) se puede acortar a 7 a 14 días, como se discute en detalle a continuación, así como en los ejemplos y figuras. En algunas formas de realización, la primera expansión (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 27) se acorta a 11 días y la segunda expansión (por ejemplo, una expansión como se describe en la etapa D en la Figura 27) se acorta a 11 días, como se discute en los Ejemplos y se muestra en
- 20 las Figuras 4, 5 y 27. En algunas formas de realización, la combinación de la primera expansión y la segunda expansión (por ejemplo, las expansiones descritas como Etapa B y Etapa D en la Figura 27) se acorta a 22 días, como se explica en detalle a continuación y en los ejemplos y figuras.

- Las denominaciones de "etapa" A, B, C, etc., más adelante, se refieren a la figura 27 y a determinadas formas de realización descritas en el presente documento. El orden de las etapas a continuación y en la Figura 27 es
- 25 ejemplar y cualquier combinación u orden de etapas, así como etapas adicionales, repetición de etapas y/u omisión de etapas está contemplada por la presente solicitud y los procedimientos descritos en este documento.

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

- En general, los TIL se obtienen inicialmente de una muestra de tumor del paciente ("TIL primarios") y luego se expanden a una población más grande para su manipulación adicional como se describe en este documento, opcionalmente criopreservados, reestimulados como se describe en este documento y opcionalmente
- 30 evaluados para fenotipo y parámetros metabólicos como una indicación de la salud de TIL.

- Puede obtenerse una muestra de tumor de un paciente usando procedimientos conocidos en la técnica, generalmente mediante extirpación quirúrgica, biopsia con aguja u otros medios para obtener una muestra que
- 35 contiene una mezcla de células tumorales y TIL. En general, la muestra de tumor puede ser de cualquier tumor sólido, incluidos tumores primarios, tumores invasores o tumores metastásicos. La muestra de tumor también puede ser un tumor líquido, como un tumor obtenido de una neoplasia maligna hematológica. El tumor sólido puede ser de cualquier tipo de cáncer, incluidos, entre otros, mama, páncreas, próstata, colorrectal, pulmón, cerebro, riñón, estómago y piel (incluidos, entre otros, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células
- 40 basales y melanoma). En algunas formas de realización, se obtienen TIL útiles a partir de tumores de melanoma malignos, ya que se ha informado que estos tienen niveles particularmente altos de TIL.

- El término "tumor sólido" se refiere a una masa anormal de tejido que generalmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. El término "cáncer de tumor sólido" se refiere a tumores sólidos malignos, neoplásicos o cancerosos. Los cánceres de tumores sólidos incluyen, pero no se
- 45 limitan a, sarcomas, carcinomas y linfomas, tales como cánceres de pulmón, mama, cáncer de mama triple negativo, próstata, colon, recto y vejiga. En algunas formas de realización, el cáncer se selecciona entre cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello (que incluye, por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)) glioblastoma, cáncer de ovario, sarcoma, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo y carcinoma de pulmón de células no pequeñas. La estructura
- 50 tisular de los tumores sólidos incluye compartimentos de tejido interdependientes que incluyen el parénquima (células cancerosas) y las células estromales de soporte en las que se dispersan las células cancerosas y que pueden proporcionar un microambiente de soporte.

- El término "neoplasia maligna hematológica" se refiere a cánceres de mamíferos y tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides, que incluyen, pero no se limitan a, tejidos de la sangre, médula ósea, ganglios
- 55 linfáticos y sistema linfático. Las neoplasias malignas hematológicas también se denominan "tumores líquidos". Las neoplasias malignas hematológicas incluyen, entre otras, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma linfocítico crónico (LLC), linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia monocítica aguda (LMA), linfoma de Hodgkin y linfomas no Hodgkin. El

término "neoplasia hematológica de células B" se refiere a neoplasias hematológicas que afectan a las células B.

Una vez obtenida, la muestra de tumor se fragmenta generalmente usando disección aguda en pequeños trozos de entre 1 y aproximadamente 8 mm³, siendo particularmente útil de aproximadamente 2-3 mm³. Los TIL se cultivan a partir de estos fragmentos utilizando digestiones tumorales enzimáticas. Tales digestiones tumorales pueden producirse mediante incubación en medio enzimático (por ejemplo, regulador de pH 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), glutamato de 2 mM, gentamicina de 10 mcg/ml, 30 unidades/ml de DNasa y 1.0 mg/ml de colagenasa) seguido de disociación mecánica (por ejemplo, utilizando un disociador de tejidos). Se pueden producir digestiones tumorales colocando el tumor en medios enzimáticos y disociando mecánicamente el tumor durante aproximadamente 1 minuto, seguido de incubación durante 30 minutos a 37 °C en CO₂ al 5%, seguido de ciclos repetidos de disociación mecánica e incubación en las condiciones anteriores hasta que solo queden pequeños trozos de tejido. Al final de este procedimiento, si la suspensión celular contiene una gran cantidad de glóbulos rojos o células muertas, se puede realizar una separación en gradiente de densidad utilizando polisacárido hidrófilo ramificado FICOLL para eliminar estas células. Pueden usarse procedimientos alternativos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2012/0244133 A1. Cualquiera de los procedimientos anteriores puede usarse en cualquiera de las formas de realización descritas en el presente documento para procedimientos de expansión de TIL.

En general, la suspensión de células recolectadas se denomina "población de células primarias" o población de células "recién recolectadas".

En algunas formas de realización, la fragmentación incluye la fragmentación física que incluye, por ejemplo, disección y digestión. En algunas formas de realización, la fragmentación es una fragmentación física. En algunas formas de realización, la fragmentación es disección. En algunas formas de realización, la fragmentación se realiza por digestión. En algunas formas de realización, los TIL pueden cultivarse inicialmente a partir de digestiones enzimáticas de tumores y de fragmentos tumorales obtenidos de pacientes. En una forma de realización, los TIL se pueden cultivar inicialmente a partir de digestiones tumorales enzimáticas y fragmentos tumorales obtenidos de pacientes.

En algunas formas de realización, donde el tumor es un tumor sólido, el tumor se somete a fragmentación física después de que se obtiene la muestra de tumor, por ejemplo, en la etapa A (como se proporciona en la Figura 27). En algunas formas de realización, la fragmentación se produce antes de la criopreservación. En algunas formas de realización, la fragmentación se produce después de la criopreservación. En algunas formas de realización, la fragmentación se produce después de obtener el tumor y en ausencia de cualquier criopreservación. En algunas formas de realización, el tumor se fragmenta y se colocan 10, 20, 30, 40 o más fragmentos o piezas en cada recipiente para la primera expansión. En algunas formas de realización, el tumor se fragmenta y se colocan 30 o 40 fragmentos o piezas en cada recipiente para la primera expansión. En algunas formas de realización, el tumor se fragmenta y se colocan 40 fragmentos o piezas en cada recipiente para la primera expansión. En algunas formas de realización, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 4 a aproximadamente 50 fragmentos, en los que cada fragmento tiene un volumen de aproximadamente 27 mm³. En algunas formas de realización, los fragmentos múltiples comprenden aproximadamente 30 a aproximadamente 60 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1300 mm³ a aproximadamente 1500 mm³. En algunas formas de realización, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 50 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1350 mm³. En algunas formas de realización, los fragmentos múltiples comprenden aproximadamente 50 fragmentos con una masa total de aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 1.5 gramos. En algunas formas de realización, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 4 fragmentos.

En algunas formas de realización, los TIL se obtienen a partir de fragmentos tumorales. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor se obtiene mediante disección aguda. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor tiene entre aproximadamente 1 mm³ y 10 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor tiene entre aproximadamente 1 mm³ y 8 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor es de aproximadamente 1 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor mide aproximadamente 2 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor mide aproximadamente 3 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor mide aproximadamente 4 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor mide aproximadamente 5 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor mide aproximadamente 6 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor mide aproximadamente 7 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor mide aproximadamente 8 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor mide aproximadamente 9 mm³. En algunas formas de realización, el fragmento de tumor tiene aproximadamente 10 mm³.

En algunas formas de realización, los TIL se obtienen a partir de digestiones de tumor. En algunas formas de realización, los digeridos tumorales se generaron mediante incubación en medio enzimático, por ejemplo, pero sin limitarse a RPMI 1640, GlutaMAX de 2 mM, gentamicina de 10 mg/ml, DNasa de 30 U/ml y colagenasa de

1.0 mg/ml, seguido de disociación mecánica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Después de colocar el tumor en medio enzimático, el tumor se puede disociar mecánicamente durante aproximadamente 1 minuto. Luego, la solución se puede incubar durante 30 minutos a 37 °C en CO₂ al 5% y luego se puede romper mecánicamente nuevamente durante aproximadamente 1 minuto. Después de incubarse nuevamente durante 30 minutos a 37 °C en CO₂ al 5%, el tumor puede romperse mecánicamente por tercera vez durante aproximadamente 1 minuto. En algunas formas de realización, después de la tercera rotura mecánica, si estaban presentes grandes trozos 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 CO₂ al 5%. En algunas formas de realización, al terminare la incubación final, si la suspensión celular contenía un gran número de glóbulos rojos o células muertas, se puede realizar una separación en gradiente de densidad usando Ficoll para eliminar estas células.

En algunas formas de realización, la suspensión de células recolectadas antes de la primera etapa de expansión se denomina "población de células primarias" o población de células "recién recolectadas".

En algunas formas de realización, las células pueden congelarse opcionalmente después de la recolección de la muestra y almacenarse congeladas antes de pasar a la expansión descrita en la etapa B, que se describe con más detalle más adelante, así como se ejemplifica en la Figura 27.

B. ETAPA B: Primera expansión

1. TIL jóvenes

En algunas formas de realización, los presentes procedimientos proporcionan la obtención de TIL jóvenes, que son capaces de aumentar los ciclos de replicación tras la administración a un sujeto/paciente y, como tales, pueden proporcionar beneficios terapéuticos adicionales sobre los TIL más antiguos (es decir, TIL que se han sometido además a más rondas de replicación antes de la administración a un sujeto/paciente). Las características de los TIL jóvenes se han descrito en la literatura, por ejemplo, Donia, et al., *Scandinavian Journal of Immunology*, 75:157-167 (2012); Dudley et al., *Clin Cancer Res*, 16:6122-6131 (2010); Huang et al., *J Immunother*, 28(3):258-267 (2005); Besser et al., *Clin Cancer Res*, 19(17):OF1-OF9 (2013); Besser et al., *J Immunother* 32:415-423 (2009); Robbins, et al., *J Immunol* 2004; 173:7125-7130; Shen et al., *J Immunother*, 30:123-129 (2007); Zhou, et al., *J Immunother*, 28:53-62 (2005); and Tran, et al., *J Immunother*, 31:742-751 (2008).

Los diversos receptores de antígenos de los linfocitos T y B se producen por recombinación somática de un número limitado, pero grande, de segmentos de genes. Estos segmentos de genes: V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante), determinan la especificidad de enlace y las aplicaciones posteriores de inmunoglobulinas y receptores de células T (TCR). La presente invención proporciona un procedimiento para generar TIL que exhiben y aumentan la diversidad del repertorio de células T. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos por el presente procedimiento exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos mediante el presente procedimiento exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T en comparación con los TIL recién recolectados y/o TIL preparados utilizando otros procedimientos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura. 27. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos mediante el presente procedimiento exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T en comparación con los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando procedimientos denominados procedimiento 1C, como se ejemplifica en la Figura 83. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos en la primera expansión exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas formas de realización, el aumento de la diversidad es un aumento de la diversidad de inmunoglobulinas y/o la diversidad del receptor de células T. En algunas formas de realización, la diversidad está en la inmunoglobulina; está en la cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la diversidad está en la inmunoglobulina; está en la cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la diversidad está en el receptor de células T. En algunas formas de realización, la diversidad está en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma y delta. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión del receptor alfa de células T (TCR). En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión de TCR α/β .

Después de la disección o digestión de los fragmentos tumorales, por ejemplo, como se describe en la etapa A de la Figura 27, las células resultantes se cultivan en suero que contiene IL-2 en condiciones que favorecen el crecimiento de TIL sobre el tumor y otras células. En algunas formas de realización, los digeridos tumorales se incuban en pocillos de 2 ml en un medio que comprende suero AB humano inactivado con 6000 UI/ml de IL-2. Esta población de células primarias se cultiva durante un período de días, generalmente de 3 a 14 días, dando como resultado una población de TIL a granel, generalmente alrededor de 1×10^8 células TIL a granel. Alternativamente, esta población de células primarias se cultiva durante un período de 7 a 14 días, dando como resultado una población de TIL a granel, generalmente alrededor de 1×10^8 células de TIL a granel.

Alternativamente, esta población de células primarias se cultiva durante un período de 10 a 14 días, lo que da como resultado una población de TIL a granel, generalmente aproximadamente 1×10^8 células de TIL a granel. En algunas formas de realización, esta población de células primarias se cultiva durante un período de aproximadamente 11 días, lo que da como resultado una población de TIL a granel, generalmente alrededor de 1×10^8 células de TIL a granel.

En una forma de realización preferida, la expansión de TIL se puede realizar utilizando una etapa de expansión de TIL a granel inicial (por ejemplo, como los descritos en la etapa B de la Figura 27, que puede incluir procedimientos denominados pre-REP) como se describe más adelante y en el presente documento, seguido por una segunda expansión (Etapa D, incluidos los procedimientos denominados etapas del protocolo de expansión rápida (REP)) como se describe más adelante en la etapa D y en este documento, seguido de una crioconservación opcional, y seguida de una segunda Etapa D (incluidos los procedimientos denominados etapas de reestimulación REP) como se describe más adelante y en este documento. Los TIL obtenidos de este procedimiento se pueden caracterizar opcionalmente por características fenotípicas y parámetros metabólicos como se describe en el presente documento.

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

En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión se denomina "CM", una abreviatura de medios de cultivo. En algunas formas de realización, CM para la etapa B consiste en RPMI 1640 con GlutaMAX, suplementado con suero AB humano al 10%, Hepes de 25 mM y gentamicina de 10 mg/ml. En formas de realización en las que los cultivos se inician en matraces permeables al gas con una capacidad de 40 ml y un fondo de silicio permeable al gas de 10 cm^2 (por ejemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (figura 1), cada matraz se cargó con $10\text{--}40 \times 10^6$ células de digestión tumoral viables o 5-30 fragmentos tumorales en 10-40 ml de CM con IL-2. Tanto las placas de G-Rex10 como las de 24 pocillos se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C en CO_2 al 5% y 5 días después del inicio del cultivo se retiró la mitad del medio y se reemplazó con CM e IL-2 frescos y después del día 5 la mitad de los medios se cambió cada 2-3 días.

Después de la preparación de los fragmentos tumorales, las células resultantes (es decir, los fragmentos) se cultivan en suero que contiene IL-2 en condiciones que favorecen el crecimiento de TIL sobre el tumor y otras células. En algunas formas de realización, 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 este documento, en presencia de una población de células APC) con 6000 UI/ml de IL-2. Esta población de células primarias se cultiva durante un período de días, generalmente de 10 a 14 días, dando como resultado una población de TIL a granel, generalmente alrededor de 1×10^8 células de TIL a granel. En algunas formas de realización, los medios de crecimiento durante la primera expansión comprenden IL-2 o una variante de la misma. En algunas formas de realización, la IL es IL-2 humana recombinante (rhIL-2). En algunas formas de realización, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de $20\text{--}30 \times 10^6$ UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas formas de realización, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 20×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas formas de realización, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 25×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas formas de realización, la solución madre de IL-2 tiene una actividad específica de 30×10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas formas de realización, la solución madre de IL-2 tiene una concentración final de $4\text{--}8 \times 10^6$ UI/mg de IL-2. En algunas formas de realización, la solución madre de IL-2 tiene una concentración final de $5\text{--}7 \times 10^6$ UI/mg de IL-2. En algunas formas de realización, la solución madre de IL-2 tiene una concentración final de 6×10^6 UI/mg de IL-2. En algunas formas de realización, la solución madre de IL-2 se prepara como se describe en el Ejemplo 4. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 10,000 UI/ml de IL-2, alrededor de 9,000 UI/ml de IL-2, alrededor de 8,000 UI/ml de IL-2, alrededor de 7,000 UI/ml de IL-2, alrededor de 6000 UI/ml de IL-2 o alrededor de 5,000 UI/ml de IL-2. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 9,000 UI/ml de IL-2 a alrededor de 5,000 UI/ml de IL-2. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 8,000 UI/ml de IL-2 a alrededor de 6,000 UI/ml de IL-2. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 7,000 UI/ml de IL-2 a alrededor de 6,000 UI/ml de IL-2. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 6,000 UI/ml de IL-2. En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 3000 UI/ml de IL-2. En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En una forma de realización preferida, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 3000 UI/ml de IL-2. En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 1000 UI/ml, alrededor de 1500 UI/ml, alrededor de 2000 UI/ml, alrededor de 2500 UI/ml, alrededor de 3000 UI/ml, alrededor de 3500 UI/ml, alrededor de 4000 UI/ml, alrededor de 4500 UI/ml, alrededor de 5000 UI/ml, alrededor de 5500 UI/ml, alrededor de 6000 UI/ml, alrededor de 6500 UI/ml, alrededor de 7000 UI/ml, alrededor de 7500 UI/ml o alrededor de 8000 UI/ml de IL-2. En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende entre 1000 y 2000

UI/ml, entre 2000 y 3000 UI/ml, entre 3000 y 4000 UI/ml, entre 4000 y 5000 UI/ml, entre 5000 y 6000 UI/ml, entre 6000 y 7000 UI/ml, entre 7000 y 8000 UI/ml, o alrededor de 8000 UI/ml de IL-2.

En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 500 UI/ml de IL-15, alrededor de 400 UI/ml de IL-15, alrededor de 300 UI/ml de IL-15, alrededor de 200 UI/ml de IL-15, alrededor de 180 UI/ml de IL-15, alrededor de 160 UI/ml de IL-15, alrededor de 140 UI/ml de IL-15, alrededor de 120 UI/ml de IL-15 o alrededor de 100 UI/ml de IL-15. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 500 UI/ml de IL-15 a alrededor de 100 UI/ml de IL-15. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende de alrededor de 400 UI/ml de IL-15 a alrededor de 100 UI/ml de IL-15. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 300 UI/ml de IL-15 a alrededor de 100 UI/ml de IL-15. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 200 UI/ml de IL-15. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 180 UI/ml de IL-15. En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-15. En una forma de realización preferida, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 180 UI/ml de IL-15.

En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 20 UI/ml de IL-21, alrededor de 15 UI/ml de IL-21, alrededor de 12 UI/ml de IL-21, alrededor de 10 UI/ml de IL-21, alrededor de 5 UI/ml de IL-21, alrededor de 4 UI/ml de IL-21, alrededor de 3 UI/ml de IL-21, alrededor de 2 UI/ml de IL-21, alrededor de 1 UI/ml de IL-21, o alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 20 UI/ml de IL-21 a alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 15 UI/ml de IL-21 a alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 12 UI/ml de IL-21 a alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 10 UI/ml de IL-21 a alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 5 UI/ml de IL-21 a alrededor de 1 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 2 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 1 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-21. En una forma de realización preferida, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 1 UI/ml de IL-21.

En algunas formas de realización, el primer medio de cultivo de expansión se denomina "CM", una abreviatura de medios de cultivo. En algunas formas de realización, se denomina CM1 (medio de cultivo 1). En algunas formas de realización, CM consta de RPMI 1640 con GlutaMAX, suplementado con suero AB humano al 10%, Hepes de 25 mM y gentamicina de 10 mg/ml. En formas de realización en las que los cultivos se inician en matraces permeables al gas con una capacidad de 40 ml y un fondo de silicio permeable al gas de 10 cm² (por ejemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (figura 1), cada matraz se cargó con 10-40 x 10⁶ células de digestión tumoral viables o 5-30 fragmentos tumorales en 10-40 ml de CM con IL-2. Tanto las placas de G-Rex10 como las de 24 pocillos se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C en CO₂ al 5% y 5 días después del inicio del cultivo se retiró la mitad del medio y se reemplazó con CM e IL-2 frescos y después del día 5 la mitad de los medios se cambió cada 2-3 días. En algunas formas de realización, el CM es el CM1 descrito en los Ejemplos, ver Ejemplo 5. En algunas formas de realización, la primera expansión ocurre en un medio de cultivo celular inicial o en un primer medio de cultivo celular. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular inicial o el primer medio de cultivo celular comprende IL-2.

El primer procedimiento de expansión (que incluye procedimientos como, por ejemplo, los descritos en la etapa B de la Figura 27, que puede incluir los que a veces se denominan pre-REP) puede acortarse a 3-14 días, como se explica en los ejemplos y figuras. La primera expansión (incluidos los procedimientos como, por ejemplo, los descritos en la etapa B de la Figura 27, que pueden incluir los que a veces se denominan pre-REP) se puede acortar a 7 a 14 días, como se explica en los Ejemplos y se muestra en las Figuras. 4 y 5, además de incluir, por ejemplo, una expansión como se describe en la etapa B de la Figura 27. La primera expansión de la etapa B se puede acortar a 10-14 días, como se explica en los Ejemplos y se muestra en las Figuras 4 y 5. En algunas formas de realización, la primera expansión se acorta a 11 días, como se describe en los Ejemplos y se muestra en las Figuras 4 y 5, además de incluir, por ejemplo, una expansión como se describe en la etapa B de la Figura 27.

La primera expansión de TIL puede continuar 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. La primera expansión de TIL puede continuar durante 1 día a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 2 días a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 3 a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 4 a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 5 a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 6 a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 7 días a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 8 días a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 9 días a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 10 a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 11 a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante

12 a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 13 a 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 14 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 1 día a 11 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 2 días a 11 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 3 días a 11 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 4 días a 11 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 5 días a 11 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 6 días a 11 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 7 días a 11 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 8 días a 11 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 9 días a 11 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 10 días a 11 días. La primera expansión de TIL puede continuar durante 11 días.

En algunas formas de realización, se emplea una combinación de IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21 como combinación durante la primera expansión. En algunas formas de realización, IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21, así como cualquier combinación de los mismos, pueden incluirse durante la primera expansión, incluyendo, por ejemplo, durante los procedimientos de la etapa B según la Figura 27, así como se describe en este documento. En algunas formas de realización, se emplea una combinación de IL-2, IL-15 e IL-21 como combinación durante la primera expansión. En algunas formas de realización, IL-2, IL-15 e IL-21, así como cualquier combinación de las mismas, pueden incluirse durante los procedimientos de la Etapa B según la Figura 27 y como se describe en el presente documento.

El primer procedimiento de expansión (incluidos los procedimientos denominados pre-REP; por ejemplo, Etapa B según la Figura 27) puede acortarse de 3 a 14 días, como se explica en los ejemplos y figuras. La primera expansión de la etapa B puede acortarse de 7 a 14 días, como se explica en los Ejemplos y se muestra en las Figuras 4 y 5. La primera expansión de la etapa B puede acortarse de 10 a 14 días, como se explica en los Ejemplos y se muestra en las Figuras 4, 5 y 27. En algunas formas de realización, la primera expansión se acorta a 11 días, como se explica en los Ejemplos y se muestra en las Figuras 4, 5 y 27.

En algunas formas de realización, la primera expansión, por ejemplo, la etapa B según la Figura 27, se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas formas de realización, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, se emplea un solo biorreactor. En algunas formas de realización, el único biorreactor empleado es, por ejemplo, un G-REX -10 o un G-REX -100. En algunas formas de realización, el biorreactor de sistema cerrado es un solo biorreactor.

A. ETAPA C: Transición de la primera expansión a la segunda expansión

En algunos casos, la población de TIL a granel obtenida de la primera expansión, incluida, por ejemplo, la población de TIL obtenida de, por ejemplo, la etapa B como se indica en la Figura 27, se puede crioconservar inmediatamente, utilizando los protocolos que se describen más adelante en el presente documento. Alternativamente, la población de TIL obtenida de la primera expansión, denominada segunda población de TIL, puede someterse a una segunda expansión (que puede incluir expansiones a veces denominadas REP) y luego crioconservarse como se describe más adelante. De manera similar, en el caso de que en terapia se utilicen TIL modificados genéticamente, la primera población de TIL (a veces denominada población de TIL a granel) o la segunda población de TIL (que en algunas formas de realización puede incluir poblaciones denominadas poblaciones de TIL de REP) puede someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados antes de la expansión o después de la primera expansión y antes de la segunda expansión.

En algunas formas de realización, los TIL obtenidos de la primera expansión (por ejemplo, de la etapa B como se indica en la Figura 27) se almacenan hasta que se fenotipifican para la selección. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos de la primera expansión (por ejemplo, de la etapa B como se indica en la Figura 27) no se almacenan y proceden directamente a la segunda expansión. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos de la primera expansión no se crioconservan después de la primera expansión y antes de la segunda expansión. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a alrededor de los 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, o 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a alrededor de 3 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a alrededor de 4 días y 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a alrededor de 4 días y 10 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a alrededor de 7 días y 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión se produce a alrededor de los 14 días desde que se produce la fragmentación.

En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre en 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días o 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 1 día a 14 días desde que ocurre la fragmentación. La primera expansión de

TIL puede continuar durante 2 días a 14 días. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 3 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 4 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 5 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 6 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 7 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 8 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 9 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 10 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 11 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 12 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 13 a 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a los 14 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 1 día a 11 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 2 a 11 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 3 a 11 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 4 a 11 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 5 a 11 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 6 a 11 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 7 a 11 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 8 a 11 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 9 a 11 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 10 a 11 días desde que ocurre la fragmentación. En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a los 11 días desde que ocurre la fragmentación.

En algunas formas de realización, los TIL no se almacenan después de la primera expansión y antes de la segunda expansión, y los TIL proceden directamente a la segunda expansión (por ejemplo, en algunas formas de realización, no hay almacenamiento durante la transición de la etapa B a la etapa D). como se muestra en la Figura 27). En algunas formas de realización, la transición se produce en un sistema cerrado, como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, los TIL de la primera expansión, la segunda población de TIL, procede directamente a la segunda expansión sin período de transición.

En algunas formas de realización, la transición de la primera expansión a la segunda expansión, por ejemplo, la etapa C según la Figura 27, se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas formas de realización, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, se emplea un solo biorreactor. En algunas formas de realización, el único biorreactor empleado es, por ejemplo, un G-REX -10 o un G-REX -100. En algunas formas de realización, el biorreactor de sistema cerrado es un solo biorreactor.

B. ETAPA D: Segunda expansión

En algunas formas de realización, la población de células TIL se expande en número después de la recolección y el tratamiento a granel inicial, por ejemplo, después de la etapa A y la etapa B, y la transición se denomina Etapa C, como se indica en la Figura 27). Esta expansión adicional se denomina en el presente documento segunda expansión que puede incluir procedimientos de expansión generalmente referidos en la técnica como un procedimiento de expansión rápida (REP; así como procedimientos como se indica en la etapa D de la Figura 27). La segunda expansión se logra generalmente usando un medio de cultivo que comprende varios componentes que incluyen células alimentadoras, una fuente de citocina y un anticuerpo anti-CD3, en un recipiente permeable a los gases.

En algunas formas de realización, la segunda expansión o la segunda expansión de TIL (que puede incluir expansiones a veces denominadas REP; así como los procedimientos indicados en la etapa D de la Figura 27) de TIL se puede realizar utilizando cualquier matraz o recipiente TIL conocido por los expertos en la técnica. La segunda expansión de TIL puede continuar durante 7 días, 8 días, 9 días o 10 días. En algunas formas de realización, la segunda expansión de TIL puede continuar durante 11 días. La segunda expansión de TIL puede continuar durante 12 días, 13 días o 14 días. La segunda expansión de TIL puede continuar durante alrededor de 7 días a alrededor de 14 días. La segunda expansión de TIL puede continuar durante alrededor de 8 días a

alrededor de 14 días. La segunda expansión de TIL puede continuar durante alrededor de 9 días a alrededor de 14 días. La segunda expansión de TIL puede continuar durante alrededor de 10 días a alrededor de 14 días. La segunda expansión de TIL puede continuar durante alrededor de 11 días a alrededor de 14 días. La segunda expansión de TIL puede continuar durante alrededor de 12 días a alrededor de 14 días. La segunda expansión de TIL puede continuar durante alrededor de 13 días a alrededor de 14 días. La segunda expansión de TIL puede continuar durante unos 14 días.

En una forma de realización, la segunda expansión se puede realizar en un recipiente permeable al gas usando los procedimientos de la presente divulgación (que incluyen, por ejemplo, expansiones denominadas REP; así como procedimientos como se indican en la etapa D de la Figura 27). Por ejemplo, los TIL se pueden expandir rápidamente usando la estimulación del receptor de células T inespecíficas en presencia de interleucina-2 (IL-2) o interleucina-15 (IL-15). El estímulo inespecífico del receptor de células T puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3, tal como alrededor de 30 ng/mL de OKT3, un anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón (disponible comercialmente en Ortho-McNeil, Raritan, NJ o Miltenyi Biotech, Auburn, CA) o UHCT-1 (disponible comercialmente en BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.). Los TIL se pueden expandir para inducir una estimulación adicional de los TIL in vitro al incluir uno o más antígenos durante la segunda expansión, incluidas porciones antigénicas de los mismos, como epítipo(s), del cáncer, que pueden expresarse opcionalmente a partir de un vector, como como péptido de unión al antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), por ejemplo, 0.3 μ M MART-1: 26-35 (27 L) o gpl 00: 209-217 (210 M), opcionalmente en presencia de un crecimiento de células T factor, como 300 UI/ml de IL-2 o IL-15. Otros antígenos adecuados pueden incluir, por ejemplo, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno de cáncer de tirosinasa, MAGE-A3, SSX-2 y VEGFR2, o porciones antigénicas de los mismos. TIL también se puede expandir rápidamente mediante reestimulación con el mismo o los mismos antígenos del cáncer pulsados sobre células presentadoras de antígeno que expresan HLA-A2. Alternativamente, los TIL se pueden volver a estimular con, por ejemplo, linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2. En algunas formas de realización, la reestimulación se produce como parte de la segunda expansión. En algunas formas de realización, la segunda expansión se produce en presencia de linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2.

En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 3000 UI/ml de IL-2. En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 1000 UI/ml, alrededor de 1500 UI/ml, alrededor de 2000 UI/ml, alrededor de 2500 UI/ml, alrededor de 3000 UI/ml, alrededor de 3500 UI/ml, alrededor de 4000 UI/ml, alrededor de 4500 UI/ml, alrededor de 5000 UI/ml, alrededor de 5500 UI/ml, alrededor de 6000 UI/ml, alrededor de 6500 UI/ml, alrededor de 7000 UI/ml, alrededor de 7500 UI/ml o alrededor de 8000 UI/ml de IL-2. En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende entre 1000 y 2000 UI/ml, entre 2000 y 3000 UI/ml, entre 3000 y 4000 UI/ml, entre 4000 y 5000 UI/ml, entre 5000 y 6000 UI/ml, entre 6000 y 7000 UI/ml, entre 7000 y 8000 UI/ml, o entre 8000 UI/ml de IL-2.

En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende anticuerpo OKT3. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 30 ng/mL de anticuerpo OKT3. En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 0.1 ng/mL, alrededor de 0.5 ng/mL, alrededor de 1 ng/mL, alrededor de 2.5 ng/mL, alrededor de 5 ng/mL, alrededor de 7.5 ng/mL, alrededor de 10 ng/mL, alrededor de 15 ng/mL, alrededor de 20 ng/mL, alrededor de 25 ng/mL, alrededor de 30 ng/mL, alrededor de 35 ng/mL, alrededor de 40 ng/mL, alrededor de 50 ng/mL, alrededor de 60 ng/mL, alrededor de 70 ng/mL, alrededor de 80 ng/mL, alrededor de 90 ng/mL, alrededor de 100 ng/mL, alrededor de 200 ng/mL, alrededor de 500 ng/mL y alrededor de 1 μ g/ml de anticuerpo OKT3. En una forma de 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 formas de realización, se emplea una combinación de IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21 como combinación durante la segunda expansión. En algunas formas de realización, IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21, así como cualquier combinación de los mismos, pueden incluirse durante la segunda expansión, incluyendo, por ejemplo, durante un procedimiento de la etapa D según la Figura 27, así como se describe en este documento. En algunas formas de realización, se emplea una combinación de IL-2, IL-15 e IL-21 como combinación durante la segunda expansión. En algunas formas de realización, IL-2, IL-15 e IL-21, así como cualquier combinación de las mismas, pueden incluirse durante los procedimientos de la Etapa D según la Figura 27 y como se describe en el presente documento.

En algunas formas de realización, la segunda expansión se puede realizar en un medio de cultivo celular suplementado que comprende IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas formas de realización, la segunda expansión se produce en un medio de cultivo celular suplementado. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular suplementado comprende IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC; también denominadas células alimentadoras presentadoras de antígeno). En algunas formas de realización, la segunda expansión se produce

en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno (es decir, células presentadoras de antígeno).

- En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 500 UI/ml de IL-15, alrededor de 400 UI/ml de IL-15, alrededor de 300 UI/ml de IL-15, alrededor de 200 UI/ml de IL-15, alrededor de 180 UI/ml de IL-15, alrededor de 160 UI/ml de IL-15, alrededor de 140 UI/ml de IL-15, alrededor de 120 UI/ml de IL-15 o alrededor de 100 UI/ml de IL-15. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de alrededor de 500 UI/ml de IL-15 a alrededor de 100 UI/ml de IL-15. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 400 UI/ml de IL-15 a alrededor de 100 UI/ml de IL-15. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 300 UI/ml de IL-15 a alrededor de 100 UI/ml de IL-15. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 200 UI/ml de IL-15. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 180 UI/ml de IL-15. En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-15. En una forma de realización preferida, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 180 UI/ml de IL-15.
- En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 20 UI/ml de IL-21, alrededor de 15 UI/ml de IL-21, alrededor de 12 UI/ml de IL-21, alrededor de 10 UI/ml de IL-21, alrededor de 5 UI/ml de IL-21, alrededor de 4 UI/ml de IL-21, alrededor de 3 UI/ml de IL-21, alrededor de 2 UI/ml de IL-21, alrededor de 1 UI/ml de IL-21, o alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 20 UI/ml de IL-21 a alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 15 UI/ml de IL-21 a alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 12 UI/ml de IL-21 a alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 10 UI/ml de IL-21 a alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 5 UI/ml de IL-21 a alrededor de 1 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión comprende alrededor de 2 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 1 UI/ml de IL-21. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 0.5 UI/ml de IL-21. En una forma de realización, el medio de cultivo celular comprende además IL-21. En una forma de realización preferida, el medio de cultivo celular comprende alrededor de 1 UI/ml de IL-21.
- En algunas formas de realización, las células alimentadoras presentadoras de antígenos (APC) son PBMC. En una forma de realización, la relación de TIL a PBMC y/o células presentadoras de antígeno en la expansión rápida y/o la segunda expansión es de alrededor de 1 a 25, alrededor de 1 a 50, alrededor de 1 a 100, alrededor de 1 a 125, alrededor de 1 a 150, alrededor de 1 a 175, alrededor de 1 a 200, alrededor de 1 a 225, alrededor de 1 a 250, alrededor de 1 a 275, alrededor de 1 a 300, alrededor de 1 a 325, alrededor de 1 a 350, alrededor de 1 a 375, alrededor de 1 a 400, o alrededor de 1 a 500. En una forma de realización, la relación de TIL a PBMC en la expansión rápida y/o la segunda expansión está entre 1 a 50 y 1 a 300. En una forma de realización, la relación de TIL a PBMC en la expansión rápida y/o la segunda expansión está entre 1 a 100 y 1 a 200.
- En una forma de realización, REP y/o la segunda expansión se realiza en matraces con los TIL a granel que se mezclan con un exceso de 100 o 200 veces de células alimentadoras inactivadas, 30 mg/ml de anticuerpo anti-CD3 OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2 en 150 ml de medio. Se realiza el reemplazo de los medios (generalmente 2/3 de los medios mediante la respiración con medios frescos) hasta que las células se transfieren a una cámara de crecimiento alternativa. Las cámaras de crecimiento alternativas incluyen matraces G-REX y recipientes permeables al gas, como se explica con más detalle más adelante.
- La segunda expansión (que puede incluir procedimientos denominados procedimiento REP) se puede acortar a 7-14 días, como se explica en los ejemplos y figuras. En algunas formas de realización, la segunda expansión se acorta a 11 días.
- En una forma de realización, REP y/o la segunda expansión se pueden realizar usando matraces T-175 y bolsas permeables al gas como se describió previamente (Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42) o material de cultivo permeable a los gases (matraces G-Rex). En algunas formas de realización, la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas expansiones rápidas) se realiza en matraces T-175, y se pueden agregar alrededor de 1×10^6 TIL suspendidos en 150 ml de medio a cada matraz T-175. Los TIL se pueden cultivar en una mezcla 1 a 1 de medio CM y AIM-V, suplementado con 3000 UI por ml de IL-2 y 30 ng por ml de anti-CD3. Los matraces T-175 se pueden incubar a 37° C en CO₂ al 5%. La mitad del medio puede intercambiarse el día 5 usando medio 50/50 con 3000 UI por ml de IL-2. En algunas formas de realización, el día 7, las células de dos matraces T-175 pueden combinarse en una bolsa de 3 l y 300 ml de AIM V con suero AB humano al 5% y se agregaron 3000 UI por ml de IL-2 a los 300 ml de suspensión de TIL. Se contó el número de células en cada bolsa cada uno o dos días y se añadió medio fresco para mantener el recuento de células entre 0.5 y 2.0×10^6 células/ml.

En una forma de realización, la segunda expansión (que puede incluir expansiones denominadas REP, así como las referidas en la etapa D de la Figura 27) se puede realizar en matraces permeables al gas de 500 ml de capacidad con fondos de silicio permeables al gas de 100 cm (G-Rex 100, disponible comercialmente en Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, EUA), 5 x 10⁶ o 10 x 10⁶ TIL se puede cultivar con PBMC en 400 ml de medio 50/50, suplementado con suero AB humano al 5%, 3000 UI por ml de IL-2 y 30 ng por ml de anti-CD3 (OKT3). Los matraces G-Rex 100 se pueden incubar a 37°C en CO₂ al 5%. El día 5 se pueden retirar 250 ml de sobrenadante y colocar en botellas de centrifuga y centrifugar a 1500 rpm (491 x g) durante 10 minutos. Los sedimentos de TIL se pueden resuspender con 150 ml de medio fresco con suero AB humano al 5%, 3000 UI por ml de IL-2 y se pueden volver a agregar a los matraces G-Rex 100 originales. Cuando los TIL se expanden en serie en matraces G-Rex 100, el día 7 el TIL de cada G-Rex 100 se puede suspender en los 300 ml de medio presentes en cada matraz y la suspensión celular se puede dividir en 3 alícuotas de 100 ml que pueden utilizarse para sembrar 3 matraces G-Rex 100. Luego, a cada matraz se pueden agregar 150 ml de AIM-V con suero AB humano al 5% y 3000 UI por ml de IL-2. Los matraces G-Rex 100 se pueden incubar a 37°C en CO₂ al 5% y después de 4 días a cada matraz G-REX 100 se pueden agregar 150 mL de AIM-V con 3000 UI por mL de IL-2. Las células se pueden recolectar el día 14 de cultivo.

En una forma de realización, la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas REP) se realiza en matraces con los TIL a granel mezclados con un exceso de 100 o 200 veces de células alimentadoras inactivadas, 30 mg/ml de anticuerpo anti-CD3 OKT3 y 3000 IL-2 UI/ml en 150 ml de medio. En algunas formas de realización, el reemplazo del medio se realiza hasta que las células se transfieren a una cámara de crecimiento alternativa. En algunas formas de realización, 2/3 del medio se reemplaza por respiración con medio fresco. En algunas formas de realización, las cámaras de crecimiento alternativas incluyen matraces G-REX y recipientes permeables a los gases, como se describe más detalladamente más adelante.

En una forma de realización, se realiza la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas REP) y comprende además una etapa en la que los TIL se seleccionan para una reactividad tumoral superior. Puede usarse cualquier procedimiento de selección conocido en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2016/0010058 A1, pueden usarse para la selección de TIL para una reactividad tumoral superior.

Opcionalmente, se puede realizar un ensayo de viabilidad celular después de la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas expansión REP), usando ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de exclusión con azul tripán en una muestra de TIL a granel, que marca selectivamente las células muertas y permite una evaluación de viabilidad. En algunas formas de realización, las muestras de TIL se pueden contar y la viabilidad se puede determinar usando un contador celular automatizado Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). En algunas formas de realización, la viabilidad se determina de acuerdo con el protocolo del Contador de Células Automático del Citómetro de Imagen Cellometer K2 descrito, por ejemplo, en el Ejemplo 15.

En algunas formas de realización, la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas REP) de TIL se puede realizar utilizando matraces T-175 y bolsas permeables al gas como se describió anteriormente (Tran KQ, Zhou J, Durlinger KH, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751, and Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342) o matraces G-Rex permeables al gas. En algunas formas de realización, la segunda expansión se realiza utilizando matraces. En algunas formas de realización, la segunda expansión se realiza utilizando matraces G-Rex permeables al gas. En algunas formas de realización, la segunda expansión se realiza en matraces T-175, y se suspenden alrededor de 1 x 10⁶ TIL en alrededor de 150 ml de medio y esto se agrega a cada matraz T-175. Los TIL se cultivan con PBMC alogénicas irradiadas (50 Gy) como células "alimentadoras" en una relación de 1 a 100 y las células se cultivan en una mezcla 1 a 1 de medio CM y AIM-V (medio 50/50), suplementado con 3000 UI/ml de IL-2 y 30 ng/mL de anti-CD3. Los matraces T-175 se incuban a 37°C en CO₂ al 5%. En algunas formas de realización, la mitad del medio se cambia el día 5 usando medio 50/50 con 3000 UI/ml de IL-2. En algunas formas de realización, el día 7, las células de 2 matraces T-175 se combinan en una bolsa de 3 l y 300 ml de AIM-V con suero AB humano al 5% y se agregan 3000 UI/ml de IL-2 a los 300 ml de suspensión de TIL. El número de células en cada bolsa se puede contar cada día o dos y se pueden agregar medios frescos para mantener el recuento de células entre alrededor de 0.5 y alrededor de 2.0 x 10⁶ células/ml.

En algunas formas de realización, la segunda expansión (incluidas las expansiones denominadas REP) se realiza en matraces de 500 ml de capacidad con fondos de silicona de 100 cm² permeables al gas (G-Rex 100, Wilson Wolf) (figura 1), se cultivan alrededor de 5x10⁶ o 10x10⁶ TIL con PBMC alogénicas irradiadas en una relación de 1 a 100 en 400 ml de medio 50/50, suplementado con 3000 UI/ml de IL-2 y 30 ng/mL de anti-CD3. Los matraces G-Rex 100 se incuban a 37°C en CO₂ al 5%. En algunas formas de realización, el día 5 se retiran 250 ml de sobrenadante y se colocan en botellas de centrifuga y se centrifugan a 1500 rpm (491 g) durante 10 minutos. Los gránulos de TIL se pueden resuspender luego con 150 ml de medio fresco 50/50 con 3000 UI/ml de IL-2 y se pueden volver a agregar a los matraces G-Rex 100 originales. En las formas de realización en las que los TIL se expanden en serie en matraces de G-Rex 100, el día 7 los TIL de cada G-Rex 100 se suspenden en los 300 ml de medio presente en cada matraz y la suspensión celular se divide en tres alícuotas de 100 ml que son utilizados para sembrar 3 matraces G-Rex 100. Más adelante, a cada matraz se agregan 150 ml de

AIM-V con suero AB humano al 5% y 3000 UI/ml de IL-2. Los matraces G-Rex 100 se incuban a 37°C en CO₂ al 5% y después de 4 días a cada matraz G-Rex 100 se agregan 150 mL de AIM-V con 3000 UI/ml de IL-2. Las células se recogen el día 14 de cultivo.

Los diversos receptores de antígenos de los linfocitos T y B se producen por recombinación somática de un número limitado, pero grande, de segmentos de genes. Estos segmentos de genes: V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante), determinan la especificidad de enlace y las aplicaciones posteriores de inmunoglobulinas y receptores de células T (TCR). La presente invención proporciona un procedimiento para generar TIL que exhiben y aumentan la diversidad del repertorio de células T. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos por el presente procedimiento exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos en la segunda expansión exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas formas de realización, el aumento de la diversidad es un aumento de la diversidad de inmunoglobulinas y/o la diversidad del receptor de células T. En algunas formas de realización, la diversidad está en la inmunoglobulina, está en la cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la diversidad está en la inmunoglobulina, está en la cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la diversidad está en el receptor de células T. En algunas formas de realización, la diversidad está en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma y delta. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión de TCRab (es decir, TCR α/β).

En algunas formas de realización, el segundo medio de cultivo de expansión (por ejemplo, a veces denominado CM2 o el segundo medio de cultivo celular), comprende IL-2, OKT-3, así como las células alimentadoras presentadoras de antígeno (APC), como se analiza en más detalles más adelante.

En algunas formas de realización, la segunda expansión, por ejemplo, la etapa D según la Figura 27, se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas formas de realización, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, se emplea un solo biorreactor. En algunas formas de realización, el único biorreactor empleado es, por ejemplo, un G-REX -10 o un G-REX -100. En algunas formas de realización, el biorreactor de sistema cerrado es un solo biorreactor.

1. Células alimentadoras y células presentadoras de antígeno

En una forma de realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en este documento (por ejemplo, incluida una expansión como las descritas en la etapa D de la Figura 27, así como las denominadas REP) requieren un exceso de células alimentadoras durante la expansión REP TIL y/o durante la segunda expansión. En muchas formas de realización, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de unidades de sangre entera estándar de donantes de sangre sanos. Las PBMC se obtienen utilizando procedimientos estándar como la separación por gradiente Ficoll-Paque.

En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se utilizan en los procedimientos de REP, como se describe en los ejemplos, en particular el ejemplo 14, que proporciona un protocolo ejemplar para evaluar la incompetencia de replicación de las PBMC alogénicas irradiadas.

En algunas formas de realización, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para su uso en los procedimientos de expansión de TIL descritos en este documento si el número total de células viables el día 14 es menor que el número de células viables inicial puestas en cultivo el día 0 del REP y/o día 0 de la segunda expansión (es decir, el día de inicio de la segunda expansión). Véase, por ejemplo, el Ejemplo 14.

En algunas formas de realización, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para su uso en los procedimientos de expansión de TIL descritos en este documento si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 y el día 14 no ha aumentado desde el número de células viables inicial puestas en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (es decir, el día de inicio de la segunda expansión). En algunas formas de realización, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 13.

En algunas formas de realización, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para su uso en los procedimientos de expansión de TIL descritos en este documento si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 y el día 14 no ha aumentado desde el número de células viables inicial puestas en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (es decir, el día de inicio de la segunda expansión). En algunas formas de realización, las PBMC se cultivan en presencia de 5-60 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 1000-6000 UI/ml de IL-2. En algunas formas de realización, las PBMC se cultivan en presencia de 10-50 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 2000-5000 UI/ml de IL-2. En algunas formas de

realización, las PBMC se cultivan en presencia de 20-40 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 2000-4000 UI/ml de IL-2. En algunas formas de realización, las PBMC se cultivan en presencia de 25-35 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 2500-3500 UI/ml de IL-2.

5 En algunas formas de realización, las células alimentadoras presentadoras de antígeno son PBMC. En algunas formas de realización, las células alimentadoras presentadoras de antígeno son células alimentadoras presentadoras de antígeno artificiales. En una forma de realización, la relación de TIL a las células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es alrededor de 1 a 25, alrededor de 1 a 50, alrededor de 1 a 100, alrededor de 1 a 125, alrededor de 1 a 150, alrededor de 1 a 175, alrededor de 1 a 200, alrededor de 1 a 225, alrededor de 1 a 250, alrededor de 1 a 275, alrededor de 1 a 300, alrededor de 1 a 325, alrededor de 1 a 350, alrededor de 1 a 375, alrededor de 1 a 400, o alrededor de 1 a 500. En una forma de realización, la relación de TIL a células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de 1 a 50 y de 1 a 300. En una forma de realización, la relación de TIL a células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión es de 1 a 100 y 1 a 200.

15 En una forma de realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en el presente documento requieren una relación de alrededor de 2.5×10^9 células alimentadoras a alrededor de 100×10^6 TIL. En otra realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en el presente documento requieren una relación de alrededor de 2.5×10^9 células alimentadoras a alrededor de 50×10^6 TIL. En otra realización más, los segundos procedimientos de expansión descritos en el presente documento requieren de alrededor de 2.5×10^9 células alimentadoras a alrededor de 25×10^6 TIL.

20 En una forma de realización, los segundos procedimientos de expansión descritos en este documento requieren un exceso de células alimentadoras durante la segunda expansión. En muchas formas de realización, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de unidades de sangre entera estándar de donantes de sangre sanos. Las PBMC se obtienen utilizando procedimientos estándar como la separación por gradiente Ficoll-Paque. En una forma de realización, se utilizan células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) en lugar de PBMC.

En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se usan en los procedimientos de expansión de TIL descritos en este documento, incluidos los procedimientos ejemplares descritos en las Figuras 4, 5 y 27.

30 En una forma de realización, las células presentadoras de antígenos artificiales se utilizan en la segunda expansión como reemplazo de, o en combinación con, PBMC.

2. Citocinas

Los procedimientos de expansión descritos en este documento generalmente usan medios de cultivo con altas dosis de una citocina, en particular IL-2, como se conoce en la técnica.

35 Alternativamente, también es posible usar combinaciones de citocinas para la expansión rápida y/o la segunda expansión de TIL, con combinaciones de dos o más de IL-2, IL-15 e IL-21 como se describe generalmente en la Publicación Internacional No. WO 2015/189356 y Publicación Internacional W No. WO 2015/189357. Por lo tanto, las posibles combinaciones incluyen IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21 e IL-2, IL-15 e IL-21, y esta última encuentra un uso particular en muchas formas de realización. El uso de combinaciones de citocinas favorece específicamente la generación de linfocitos y, en particular, de células T como se describe allí.

40 3. Anticuerpos anti-CD3

En algunas formas de realización, los medios de cultivo usados en los procedimientos de expansión descritos en el presente documento (incluidos los denominados REP, véase, por ejemplo, la Figura 27) también incluyen un anticuerpo anti-CD3. Un anticuerpo anti-CD3 en combinación con IL-2 induce la activación de las células T y división celular en la población TIL. Este efecto puede observarse con anticuerpos de longitud completa, así como con fragmentos Fab y F (ab')₂, y generalmente se prefiere el primero; véase, por ejemplo, Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719.

50 Como apreciarán los expertos en la técnica, hay varios anticuerpos CD3 anti-humanos adecuados que encuentran uso en la invención, incluidos anticuerpos policlonales y monoclonales CD3 anti-humanos de varios mamíferos, incluidos, entre otros, anticuerpos de murinos, humanos, primates, ratas y caninos. En formas de realización particulares, se usa el anticuerpo anti-CD3 OKT3 (disponible comercialmente en Ortho-McNeil, Raritan, NJ o Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

E. ETAPA E: Recolectar TIL

Después de la segunda etapa de expansión, se pueden recolectar las células. En algunas formas de realización, los TIL se recolectan después de uno, dos, tres, cuatro o más etapas de expansión, por ejemplo,

como se proporciona en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL se recolectan después de dos etapas de expansión, por ejemplo, como se muestra en la Figura 27.

Los TIL se pueden recolectar de cualquier manera apropiada y estéril, incluyendo, por ejemplo, por centrifugación. Los procedimientos para la recolección de TIL son bien conocidos en la técnica y cualquier procedimiento conocido puede emplearse con el presente procedimiento. En algunas formas de realización, los TIL se recolectan usando un sistema automatizado.

Los recolectores de células y/o los sistemas de tratamiento de células están disponibles comercialmente en una variedad de fuentes, que incluyen, por ejemplo, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer e Inotech Biosystems International, Inc. Cualquier recolector de células puede emplearse con los procedimientos presentes. En algunas formas de realización, el recolector de células y/o los sistemas de tratamiento de células es un recolector de células basado en membrana. En algunas formas de realización, la recolección de células se realiza mediante un sistema de tratamiento de células, como el sistema LOVO (fabricado por Fresenius Kabi). El término "sistema de tratamiento de células LOVO" también se refiere a cualquier instrumento o dispositivo fabricado por cualquier proveedor que pueda bombear una solución que comprende células a través de una membrana o filtro, como una membrana giratoria o un filtro giratorio, en un entorno de sistema cerrado y/o estéril, lo que permite flujo continuo y tratamiento celular para eliminar el sobrenadante o los medios de cultivo celular sin formación de pellas. En algunas formas de realización, el recolector de células y/o el sistema de tratamiento de células puede realizar la separación de células, lavado, intercambio de fluidos, concentración y/u otras etapas de tratamiento de células en un sistema estéril cerrado.

En algunas formas de realización, la recolección, por ejemplo, la etapa E según la Figura 27, se realiza desde un biorreactor de sistema cerrado. En algunas formas de realización, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, se emplea un solo biorreactor. En algunas formas de realización, el único biorreactor empleado es, por ejemplo, un G-REX -10 o un G-REX -100. En algunas formas de realización, el biorreactor de sistema cerrado es un solo biorreactor.

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

Después de que las etapas A a E como se proporcionan en un orden ejemplar en la Figura 27 y como se describe en detalle anteriormente y en el presente documento estén completos, las células se transfieren a un recipiente para su uso en la administración a un paciente. En algunas formas de realización, una vez que se obtiene un número terapéuticamente suficiente de TIL usando los procedimientos de expansión descritos anteriormente, se transfieren a un recipiente para su uso en la administración a un paciente.

Los TIL expandidos usando APC de la presente divulgación pueden ser para la administración a un paciente como una composición farmacéutica. En una forma de realización, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un regulador de pH estéril. Los TIL expandidos usando PBMC de la presente divulgación pueden administrarse mediante cualquier ruta adecuada como se conoce en la técnica. En algunas formas de realización, las células T se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferiblemente dura alrededor de 30 a 60 minutos. Otras vías de administración adecuadas incluyen intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

1. Composiciones farmacéuticas, dosis y regímenes de dosificación

En una forma de realización, los TIL expandidos usando los procedimientos de la presente divulgación son para la administración a un paciente como una composición farmacéutica. En una forma de realización, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un regulador de pH estéril. Los TIL expandidos usando PBMC de la presente divulgación pueden administrarse mediante cualquier ruta adecuada como se conoce en la técnica. En algunas formas de realización, las células T se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferiblemente dura alrededor de 30 a 60 minutos. Otras vías de administración adecuadas incluyen la administración intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

Puede administrarse cualquier dosis adecuada de TIL. En algunas formas de realización, se administran de alrededor de 2.3×10^{10} a alrededor de 13.7×10^{10} TIL, con un promedio de alrededor de 7.8×10^{10} TIL, particularmente si el cáncer es melanoma. En una forma de realización, se administran de alrededor de 1.2×10^{10} a alrededor de 4.3×10^{10} TIL. En algunas formas de realización, se administran de alrededor de 3×10^9 a alrededor de 12×10^{10} TIL. En algunas formas de realización, se administran de alrededor de 4×10^{10} a alrededor de 10×10^{10} TIL. En algunas formas de realización, se administran de alrededor de 5×10^{10} a alrededor de 8×10^{10} TIL. En algunas formas de realización, se administran de alrededor de 6×10^{10} a alrededor de 8×10^{10} TIL. En algunas formas de realización, se administran de alrededor de 7×10^{10} a alrededor de 8×10^{10} TIL. En algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz es de alrededor de 2.3×10^{10} a alrededor de 13.7×10^{10} . En algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz es de alrededor de 7.8×10^{10} TIL, particularmente del cáncer es melanoma. En algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz es de alrededor de 1.2×10^{10} a alrededor de 4.3×10^{10} de TIL. En algunas formas de

realización, la dosis terapéuticamente eficaz es de alrededor de 3×10^{10} a alrededor de 12×10^{10} TIL. En algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz es de alrededor de 4×10^{10} a alrededor de 10×10^{10} TIL. En algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz es de alrededor de 5×10^{10} a alrededor de 8×10^{10} TIL. En algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz es de alrededor de 6×10^{10} a alrededor de 8×10^{10} TIL. En algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz es de alrededor de 7×10^{10} a alrededor de 8×10^{10} TIL.

En algunas formas de realización, el número de TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es alrededor de 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} y 9×10^{13} .

En una forma de realización, el número de TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el rango de 1×10^6 a 5×10^6 , 5×10^6 a 1×10^7 , 1×10^7 a 5×10^7 , 5×10^7 a 1×10^8 , 1×10^8 a 5×10^8 , 5×10^8 a 1×10^9 , 1×10^9 a 5×10^9 , 5×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^{10} a 52×10^{10} , 5×10^{10} a 1×10^{11} , 5×10^{11} a 1×10^{12} , 1×10^{12} a 5×10^{12} y 5×10^{12} a 1×10^{13} .

En algunas formas de realización, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es menor que, por ejemplo, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3 %, 2%, 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% o 0.0001% p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas formas de realización, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es superior al 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75 % , 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25 % 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75% , 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25% 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25% 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25% 2%, 1,75%, 1,50% , 1,25% 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009 %, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% o 0.0001% p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas formas de realización, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de alrededor de 0.0001% a alrededor de 50%, alrededor de 0.001% a alrededor de 40%, alrededor de 0.01% a alrededor de 30%, alrededor de 0.02% a alrededor de 29%, alrededor de 0.03% a alrededor de 28%, alrededor de 0.04% a alrededor de 27%, alrededor de 0.05% a alrededor de 26%, alrededor de 0.06% a alrededor de 25%, alrededor de 0.07% a alrededor de 24%, alrededor de 0.08% a alrededor de 23%, alrededor de 0.09% a alrededor de 22%, alrededor de 0.1% a alrededor de 21%, alrededor de 0.2% a alrededor de 20%, alrededor de 0.3% a alrededor de 19%, alrededor de 0.4% a alrededor de 18%, alrededor de 0.5% a alrededor de 17%, alrededor de 0.6% a alrededor de 16%, alrededor de 0.7% a alrededor de 15%, alrededor de 0.8% a alrededor de 14%, alrededor de 0.9% a alrededor de 12% o alrededor de 1% a alrededor de 10% p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas formas de realización, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de alrededor de 0.001% a alrededor de 10%, alrededor de 0.01% a alrededor de 5%, alrededor de 0.02% a alrededor de 4.5%, alrededor de 0.03% a alrededor de 4%, alrededor de 0.04% a alrededor de 3.5%, alrededor de 0.05% a alrededor de 3%, alrededor de 0.06% a alrededor de 2.5%, alrededor de 0.07% a alrededor de 2%, alrededor de 0.08% a alrededor de 1.5%, alrededor de 0.09% a alrededor de 1 %, alrededor de 0.1% a alrededor de 0.9% p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas formas de realización, la cantidad de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es igual o menor que 10 g, 9.5 g, 9.0 g, 8.5 g, 8.0 g, 7.5 g, 7.0 g, 6.5 g, 6.0 g, 5.5 g, 5.0 g, 4.5 g, 4.0 g, 3.5 g, 3.0 g, 2.5 g, 2.0 g, 1.5 g, 1.0 g, 0.95 g, 0.9 g, 0.85 g, 0.8 g, 0.75 g, 0.7 g, 0.65 g , 0.6 g, 0.55 g, 0.5 g, 0.45 g, 0.4 g, 0.35 g, 0.3 g, 0.25 g, 0.2 g, 0.15 g, 0.1 g, 0.09 g, 0.08 g, 0.07 g, 0.06 g, 0.05 g, 0.04 g, 0.03 g, 0.02 g, 0.01 g, 0.009 g, 0.008 g, 0.007 g, 0.006 g, 0.005 g, 0.004 g, 0.003 g, 0.002 g, 0.001 g, 0.0009 g, 0.0008 g, 0.0007 g, 0.0006 g, 0.0005 g, 0.0004 g, 0.0003 g, 0.0002 g o 0.0001 g.

En algunas formas de realización, la cantidad de TIL proporcionada en las composiciones farmacéuticas de la invención es más de 0.0001 g, 0.0002 g, 0.0003 g, 0.0004 g, 0.0005 g, 0.0006 g, 0.0007 g, 0.0008 g, 0.0009 g, 0.001 g, 0.0015 g, 0.002 g, 0.0025 g, 0.003 g, 0.0035 g, 0.004 g, 0.0045 g, 0.005 g, 0.0055 g, 0.006 g, 0.0065 g, 0.007 g, 0.0075 g, 0.008 g, 0.0085 g, 0.009 g, 0.0095 g , 0.01 g, 0.015 g, 0.02 g, 0.025 g, 0.03 g, 0.035 g,

0.04 g, 0.045 g, 0.05 g, 0.055 g, 0.06 g, 0.065 g, 0.07 g, 0.075 g, 0.08 g, 0.085 g, 0.09 g, 0.095 g, 0.1 g, 0.15 g, 0.2 g, 0.25 g, 0.3 g, 0.35 g, 0.4 g, 0.45 g, 0.5 g, 0.55 g, 0.6 g, 0.65 g, 0.7 g, 0.75 g, 0.8 g, 0.85 g, 0.9 g, 0.95 g, 1 g, 1.5 g, 2 g, 2.5 g, 3 g, 3.5 g, 4 g, 4.5 g, 5 g, 5.5 g, 6 g, 6.5 g, 7 g, 7.5 g, 8 g, 8.5 g, 9 g, 9.5 g o 10 g.

5 Los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención son eficaces en un amplio intervalo de dosis. La dosis exacta dependerá de la vía de administración, la forma en la que se administra el compuesto, el sexo y la edad del sujeto a tratar, el peso corporal del sujeto a tratar y la preferencia y experiencia del médico tratante. Las dosis clínicamente establecidas de los TIL también pueden usarse si es apropiado. Las cantidades de las composiciones farmacéuticas administradas utilizando los procedimientos del presente documento, como las dosis de TIL, dependerán del ser humano o mamífero que se esté tratando, la gravedad del trastorno o afección, la velocidad de administración y la disposición de los ingredientes farmacéuticos activos. y la discreción del médico que prescribe.

10 En algunas formas de realización, los TIL pueden administrarse en una sola dosis. Tal administración puede ser mediante inyección, por ejemplo, inyección intravenosa. En algunas formas de realización, los TIL pueden administrarse en múltiples dosis. La dosificación puede ser una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de seis veces al año. La dosificación puede ser una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana o una vez cada dos días. La administración de TIL puede continuar tanto tiempo como sea necesario.

20 En algunas formas de realización, una dosis eficaz de TIL es alrededor de 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} y 9×10^{13} . En algunas formas de realización, una dosificación eficaz de TIL está en el intervalo de 1×10^6 a 5×10^6 , 1×10^7 a 5×10^7 , 1×10^8 a 5×10^8 , 1×10^9 a 5×10^9 , 1×10^{10} a 5×10^{10} , 1×10^{11} a 5×10^{11} , 1×10^{12} a 5×10^{12} y 1×10^{13} .

30 En algunas formas de realización, una dosis eficaz de TIL está en el intervalo de alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 4.3 mg/kg, alrededor de 0.15 mg/kg a alrededor de 3.6 mg/kg, alrededor de 0.3 mg/kg a alrededor de 3.2 mg/kg, alrededor de 0.35 mg/kg a alrededor de 2.85 mg/kg, alrededor de 0.15 mg/kg a alrededor de 2.85 mg/kg, alrededor de 0.3 mg a alrededor de 2.15 mg/kg, alrededor de 0.45 mg/kg a alrededor de 1.7 mg/kg, alrededor de 0.15 mg/kg a alrededor de 1.3 mg/kg, alrededor de 0.3 mg/kg a alrededor de 1.15 mg/kg, alrededor de 0.45 mg/kg a alrededor de 1 mg/kg, alrededor de 0.55 mg/kg a alrededor de 0.85 mg/kg, alrededor de 0.65 mg/kg a alrededor de 0.8 mg/kg, alrededor de 0.7 mg/kg a alrededor de 0.75 mg/kg, alrededor de 0.7 mg/kg a alrededor de 2.15 mg/kg, alrededor de 0.85 mg/kg a alrededor de 2 mg/kg, alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 1.85 mg/kg, alrededor de 1.15 mg/kg a alrededor de 1.7 mg/kg, alrededor de 1.3 mg/kg a alrededor de 1.6 mg/kg, alrededor de 1.35 mg/kg a alrededor de 1.5 mg/kg, alrededor de 2.15 mg/kg a alrededor de 3.6 mg/kg, alrededor de 2.3 mg/kg a alrededor de 3.4 mg/kg, alrededor de 2.4 mg/kg a alrededor de 3.3 mg/kg, alrededor de 2.6 mg/kg a alrededor de 3.15 mg/kg, alrededor de 2.7 mg/kg a alrededor de 3 mg/kg, alrededor de 2.8 mg/kg a alrededor de 3 mg/kg, o alrededor de 2.85 mg/kg hasta alrededor de 2.95 mg/kg.

40 En algunas formas de realización, una dosis eficaz de TIL está en el intervalo de alrededor de 1 mg a alrededor de 500 mg, alrededor de 10 mg a alrededor de 300 mg, alrededor de 20 mg a alrededor de 250 mg, alrededor de 25 mg a alrededor de 200 mg, alrededor de 1 mg a alrededor de 50 mg, alrededor de 5 mg a alrededor de 45 mg, alrededor de 10 mg a alrededor de 40 mg, alrededor de 15 mg a alrededor de 35 mg, alrededor de 20 mg a alrededor de 30 mg, alrededor de 23 mg a alrededor de 28 mg, alrededor de 50 mg a alrededor de 150 mg, alrededor de 60 mg a alrededor de 140 mg, alrededor de 70 mg a alrededor de 130 mg, alrededor de 80 mg a alrededor de 120 mg, alrededor de 90 mg a alrededor de 110 mg, o alrededor de 95 mg a alrededor de 105 mg, alrededor de 98 mg a alrededor de 102 mg, alrededor de 150 mg a alrededor de 250 mg, alrededor de 160 mg a alrededor de 240 mg, alrededor de 170 mg a alrededor de 230 mg, alrededor de 180 mg a alrededor de 220 mg, alrededor de 190 mg a alrededor de 210 mg, alrededor de 195 mg a alrededor de 205 mg, o alrededor de 198 a alrededor de 207 mg.

Se puede administrar una cantidad eficaz de TIL en dosis únicas o múltiples mediante cualquiera de los modos aceptados de administración de agentes que tienen utilidades similares, incluidas las vías intranasal y transdérmica, mediante inyección intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, por vía tópica, por trasplante o por inhalación.

55 G. Análisis de viabilidad celular opcional

Opcionalmente, se puede realizar un ensayo de viabilidad celular después de la primera expansión de la etapa B, usando ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de exclusión con azul tripán en una muestra de TIL a granel, que marca selectivamente las células muertas y permite una

evaluación de viabilidad. Otros ensayos para usar en las pruebas de viabilidad pueden incluir, entre otros, el ensayo de azul de Alamar; y el ensayo MTT.

1. Recuento celular, viabilidad, citometría de flujo

En algunas formas de realización, se miden los recuentos de células y/o la viabilidad. La expresión de marcadores como, entre otros, CD3, CD4, CD8 y CD56, así como cualquier otro divulgado o descrito en el presente documento, se puede medir mediante citometría de flujo con anticuerpos, por ejemplo, pero sin limitarse a los disponibles comercialmente en BD Biosciences (BD Biosciences, San José, CA) utilizando un citómetro de flujo FACSCanto™ (BD Biosciences). Las células se pueden contar manualmente usando un hemocitómetro de chip c desechable (VWR, Batavia, IL) y la viabilidad se puede evaluar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluye, entre otros, la tinción con azul tripán.

En algunos casos, la población de TIL a granel se puede crioconservar inmediatamente, utilizando los protocolos que se describen más adelante. Alternativamente, la población de TIL a granel puede someterse a REP y luego crioconservarse como se describe más adelante. De manera similar, en el caso de que en terapia se utilicen TIL modificados genéticamente, las poblaciones de REP TIL a granel pueden someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados.

2. Cultivos celulares

En una forma de realización, un procedimiento para expandir TIL puede incluir el uso de alrededor de 5,000 ml a alrededor de 25,000 ml de medio celular, de alrededor de 5,000 ml a alrededor de 10,000 ml de medio celular o de alrededor de 5,800 ml a alrededor de 8,700 ml de medio celular. En una forma de realización, expandir el número de TIL no usa más de un tipo de medio de cultivo celular. Puede usarse cualquier medio de cultivo celular adecuado, por ejemplo, medio celular AIM-V (L-glutamina, sulfato de estreptomicina de 50 µM y sulfato de gentamicina de 10 µM) medio de cultivo celular (Invitrogen, Carlsbad CA). A este respecto, los procedimientos de la invención reducen ventajosamente la cantidad de medio y el número de tipos de medio requeridos para expandir el número de TIL. En una forma de realización, expandir el número de TIL puede comprender agregar medio de cultivo celular fresco a las células (también denominado alimentación de las células) no más frecuentemente que cada tercer o cuarto día. La expansión del número de células en un recipiente permeable al gas simplifica los procedimientos necesarios para expandir el número de células al reducir la frecuencia de alimentación necesaria para expandir las células.

En una forma de realización, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases no está filtrado. El uso de medio celular sin filtrar puede simplificar los procedimientos necesarios para expandir el número de células. En una forma de realización, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases carece de beta-mercaptoetanol (BME).

En una forma de realización, la duración del procedimiento comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable al gas que contiene medio celular; obtener TIL de la muestra de tejido tumoral; expandir el número de TIL en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular usando aAPC durante una duración de alrededor de 14 a alrededor de 42 días, por ejemplo, alrededor de 28 días.

En una forma de realización, los TIL se expanden en contenedores permeables a los gases. Se han utilizado recipientes permeables a los gases para expandir TIL utilizando PBMC utilizando procedimientos, composiciones y dispositivos conocidos en la técnica, incluidos los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2005/0106717 A1. En una forma de realización, los TIL se expanden en bolsas permeables a los gases. En una forma de realización, los TIL se expanden utilizando un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables al gas, como el Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). En una forma de realización, los TIL se expanden usando un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables al gas, como el WAVE Bioreactor System, también conocido como Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). En una forma de realización, el sistema de expansión celular incluye una bolsa celular permeable a los gases con un volumen seleccionado del grupo que consta de alrededor de 100 ml, alrededor de 200 ml, alrededor de 300 ml, alrededor de 400 ml, alrededor de 500 ml, alrededor de 600 ml, alrededor de 700 ml, alrededor de 800 ml, alrededor de 900 ml, alrededor de 1 L, alrededor de 2 L, alrededor de 3 L, alrededor de 4 L, alrededor de 5 L, alrededor de 6 L, alrededor de 7 L, alrededor de 8 L, alrededor de 9 L y alrededor de 10 L. En una forma de realización, los TIL se pueden expandir en matraces G-Rex (disponibles comercialmente en Wilson Wolf Manufacturing). Tales formas de realización permiten que las poblaciones de células se expandan desde alrededor de 5×10^5 células/cm² a entre 10×10^6 y 30×10^6 células/cm². En una forma de realización, esta expansión se lleva a cabo sin agregar medio de cultivo celular fresco a las células (también denominado alimentación de las células). En una forma de realización, esto es sin alimentación siempre que el medio resida a una altura de alrededor de 10 cm en el matraz G-Rex. En una forma de realización, esto es sin alimentación, pero con la adición de una o más citocinas. En una forma de realización, la citocina se puede agregar como un bolo sin necesidad de mezclar la citocina con el medio. Dichos contenedores, dispositivos y procedimientos son conocidos en la técnica y se han utilizado para

expandir los TIL, e incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2014/0377739A1, publicación internacional No. WO 2014/210036 A1, publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2013/0115617 A1, publicación internacional No. WO 2013/188427 A1, solicitud de patente de EE. UU. No. US 2011/0136228 A1, patente de EE. UU. No. US 8.809,050 B2, publicación internacional No. WO 2011/072088 A2, publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2016/0208216 A1, publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2012/0244133 A1, publicación internacional No. WO 2012/129201 A1, publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2013/0102075 A1, patente de EE. UU. No. US 8,956,860 B2, publicación internacional No. WO 2013/173835 A1, publicación de solicitud de patente estadounidense No. US 2015/0175966 A1. Dichos procedimientos también se describen en Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292. Optional Genetic Engineering of TILs.

En algunas formas de realización, los TIL se diseñan opcionalmente genéticamente para incluir funcionalidades adicionales que incluyen, entre otras, un receptor de células T de alta afinidad (TCR), por ejemplo, un TCR dirigido a un antígeno asociado a un tumor como MAGE-1, HER2 o NY-ESO-1, o un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a una molécula de la superficie celular asociada a un tumor (por ejemplo, mesotelina) o una molécula de la superficie celular de linaje restringido (por ejemplo, CD19).

H. Crioconservación opcional de TIL

Como se discutió anteriormente, y se ejemplificó en las etapas A a E como se proporciona en la Figura 27, la crioconservación puede ocurrir en numerosos puntos a lo largo del procedimiento de expansión de TIL. En algunas formas de realización, la población expandida de TIL después de la segunda expansión (como se proporciona, por ejemplo, según la etapa D de la Figura 27) se puede crioconservar. La crioconservación generalmente se puede lograr colocando la población de TIL en una solución de congelación, por ejemplo, suero AB inactivado con suplemento al 85% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 15%. Las células en solución se colocan en viales criogénicos y se almacenan durante 24 horas a -80°C, con transferencia opcional a congeladores de nitrógeno gaseoso para crioconservación. Véase Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986. En algunas formas de realización, los TIL se crioconservan en DMSO al 5%. En algunas formas de realización, los TIL se crioconservan en medio de cultivo celular más DMSO al 5%. En algunas formas de realización, los TIL se crioconservan de acuerdo con los procedimientos proporcionados en los Ejemplos 8 y 9.

Cuando sea apropiado, las células se sacan del congelador y se descongelan en un baño de agua a 37°C hasta que alrededor de 4/5 de la solución se descongelan. Las células generalmente se resuspenden en medio completo y opcionalmente se lavan una o más veces. En algunas formas de realización, los TIL descongelados pueden contarse y evaluarse para determinar su viabilidad como se conoce en la técnica.

I. Características fenotípicas de los TIL expandidos

En alguna forma de realización, los TIL se analizan para determinar la expresión de numerosos marcadores fenotípicos después de la expansión, incluidos los descritos en el presente documento y en los Ejemplos. En una forma de realización, se examina la expresión de uno o más marcadores fenotípicos. En algunas formas de realización, las características fenotípicas de los TIL se analizan después de la primera expansión en la etapa B. En algunas formas de realización, las características fenotípicas de los TIL se analizan durante la transición en la etapa C. En algunas formas de realización, las características fenotípicas de los TIL son analizados durante la transición según la etapa C y después de la crioconservación. En algunas formas de realización, las características fenotípicas de los TIL se analizan después de la segunda expansión según la etapa D. En algunas formas de realización, las características fenotípicas de los TIL se analizan después de dos o más expansiones según la etapa D. En algunas formas de realización, el marcador es seleccionado del grupo que consiste en TCRab (es decir, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 y HLA-DR. En algunas formas de realización, el marcador se selecciona del grupo que consiste en TCRab (es decir, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56 y CD8a. En una forma de realización, el marcador se selecciona del grupo que consiste en CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 y HLA-DR. En algunas formas de realización, se examina la expresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce marcadores. En algunas formas de realización, se examina la expresión de uno o más marcadores de cada grupo. En algunas formas de realización, se mantiene la expresión de uno o más de HLA-DR, CD38 y CD69 (es decir, no muestra una diferencia estadísticamente significativa) en TIL frescos en comparación con TIL descongelados. En algunas formas de realización, el estado de activación de los TIL se mantiene en los TIL descongelados.

En una forma de realización, se mide la expresión de uno o más marcadores reguladores. En algunas formas de realización, el marcador regulador se selecciona del grupo que consiste en CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 y CD154. En algunas formas de realización, el marcador regulador se selecciona del grupo que consiste en CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1 y TIM-3. En algunas formas de realización, el marcador regulador se selecciona del grupo que consiste en CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 y CD154. En algunas formas de realización, la expresión de la molécula reguladora disminuye en los TIL descongelados en comparación con los TIL frescos. En algunas formas de realización, la expresión de las moléculas reguladoras LAG-3 y TIM-3 disminuye en los TIL descongelados en comparación

con los TIL frescos. En algunas formas de realización, no hay una diferencia significativa en la expresión de CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$. En algunas formas de realización, no hay una diferencia significativa en la expresión de CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ y/o marcadores de memoria en TIL frescos en comparación con TIL descongelados. En algunas formas de realización, no hay una diferencia significativa en la expresión de CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ entre los TIL producidos por los procedimientos proporcionados en este documento, como se ejemplifica, por ejemplo, en la Figura 27, y/o los TIL preparados utilizando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento que incluyen, por ejemplo, procedimientos distintos a los incorporados en la Figura 27.

En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL, la población de TIL recolectada y/o la población de TIL terapéutica basada en la expresión de CD4, CD8 y/o NK, TCR $\alpha\beta$ durante ninguna de las etapas, incluidos los descritos anteriormente o los que se proporcionan, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL basada en CD4, CD8 y/o NK, TCR $\alpha\beta$. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la segunda población de TIL basada en la expresión de CD4, CD8 y/o NK, TCR $\alpha\beta$. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la tercera población de TIL basada en la expresión de CD4, CD8 y/o NK, TCR $\alpha\beta$. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la población recolectada de TIL basada en la expresión de CD4, CD8 y/o NK, TCR $\alpha\beta$. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la población terapéutica de TIL basada en la expresión de CD4, CD8 y/o NK, TCR $\alpha\beta$.

En ciertos ejemplos, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL o la población de TIL recolectada basada en la expresión de CD4, CD8 y/o NK, TCR $\alpha\beta$ durante ninguna de las etapas (a) para (f) del procedimiento para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende:

(a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un paciente convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor

(b) agregar los fragmentos de tumor a un sistema cerrado;

(c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;

(d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;

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

(f) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (e) a una bolsa de infusión, en donde la transferencia de la etapa (e) al (f) ocurre sin abrir el sistema.

En ciertos ejemplos, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL o la población de TIL recolectada basada en la expresión de CD4, CD8 y/o NK, TCR $\alpha\beta$ durante ninguna de las etapas (a) a (h) del procedimiento para tratar a un sujeto con cáncer, y el procedimiento comprende la administración de linfocitos infiltrantes de tumores expandidos (TIL) que comprende:

(a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor;

(b) agregar los fragmentos de tumor a un sistema cerrado;

(c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la

segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;

(d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;

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

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

(g) opcionalmente crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada de la etapa (f) usando un procedimiento de crioconservación; y

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

En algunas formas de realización, el marcador de memoria se selecciona del grupo que consiste en CCR7 y CD62L

En algunas formas de realización, la viabilidad de los TIL frescos en comparación con los TIL descongelados es al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos el 98%. En algunas formas de realización, la viabilidad de los TIL tanto frescos como descongelados es mayor al 70%, mayor al 75%, mayor al 80%, mayor al 85%, mayor al 90%, mayor al 95% o mayor al 98%. En algunas formas de realización, la viabilidad tanto del producto fresco como descongelado es mayor al 80%, mayor al 81%, mayor al 82%, mayor al 83%, mayor al 84%, mayor al 85%, mayor al 86%, mayor más del 87%, mayor al 88%, mayor al 89% o mayor al 90%. En algunas formas de realización, la viabilidad del producto tanto fresco como descongelado es mayor al 86%.

En una forma de realización, los TIL reestimulados también pueden evaluarse para la liberación de citocinas, usando ensayos de liberación de citocinas. En algunas formas de realización, los TIL pueden evaluarse para la secreción de interferón-7 (IFN-7) en respuesta a la estimulación con OKT3 o cocultivo con digestión de tumor autólogo. Por ejemplo, en las formas de realización que emplean estimulación con OKT3, los TIL se lavan extensamente y se preparan pocillos duplicados con 1×10^5 células en 0.2 ml de CM en placas de fondo plano de 96 pocillos recubiertas previamente con 0.1 o 1.0 $\mu\text{g/ml}$ de OKT3 diluido en solución salina con pH regulado con fosfato. Después de la incubación durante la noche, se recogen los sobrenadantes y se mide el IFN-7 en el sobrenadante mediante ELISA (Pierce/Endogen, Woburn, MA). Para el ensayo de cocultivo, se colocan 1×10^5 células de TIL en una placa de 96 pocillos con células tumorales autólogas. (Relación 1:1). Después de una incubación de 24 horas, se recogen los sobrenadantes y se puede cuantificar la liberación de IFN-7, por ejemplo, mediante ELISA.

Análisis de citometría de flujo de biomarcadores de superficie celular: Se tomaron alícuotas de muestras de TIL para análisis de citometría de flujo de marcadores de superficie celular; véase, por ejemplo, Ejemplos 7, 8 y 9.

En algunas formas de realización, los TIL se están evaluando para varios marcadores reguladores. En algunas formas de realización, el marcador regulador se selecciona del grupo que consiste en TCR α/β , CD56, CD27, CD28, CD57, CD45RA, CD45RO, CD25, CD127, CD95, IL-2R-, CCR7, CD62L, KLRG1 y CD122. En algunas formas de realización, el marcador regulador es TCR α/β . En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD56. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD27. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD28. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD57. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD45RA. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD45RO. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD25. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD127. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD95. En algunas formas de realización, el marcador regulador es IL-2R-. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CCR7. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD62L. En algunas formas de realización, el marcador regulador es KLRG1. En algunas formas de realización, el marcador regulador es CD122.

En una forma de realización, los TIL expandidos se analizan para la expresión de numerosos marcadores fenotípicos, incluidos los descritos en el presente documento y en los Ejemplos. En una forma de realización, se examina la expresión de uno o más marcadores fenotípicos. En algunas formas de realización, el marcador

se selecciona del grupo que consiste en TCRab (es decir, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 y HLA-DR. En algunas formas de realización, el marcador se selecciona del grupo que consiste en TCRab (es decir, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56 y CD8a. En una forma de realización, el marcador se selecciona del grupo que consiste en CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 y HLA-DR. En algunas formas de realización, se examina la expresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce marcadores. En algunas formas de realización, se examina la expresión de uno o más marcadores de cada grupo. En algunas formas de realización, se mantiene la expresión de uno o más de HLA-DR, CD38 y CD69 (es decir, no muestra una diferencia estadísticamente significativa) en TIL frescos en comparación con TIL descongelados. En algunas formas de realización, el estado de activación de los TIL se mantiene en los TIL descongelados.

En una forma de realización, se mide la expresión de uno o más marcadores reguladores. En algunas formas de realización, el marcador regulador se selecciona del grupo que consiste en CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 y CD154. En algunas formas de realización, el marcador regulador se selecciona del grupo que consiste en CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1 y TIM-3. En algunas formas de realización, el marcador regulador se selecciona del grupo que consiste en CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 y CD154. En algunas formas de realización, la expresión de la molécula reguladora disminuye en los TIL descongelados en comparación con los TIL frescos. En algunas formas de realización, la expresión de las moléculas reguladoras LAG-3 y TIM-3 disminuye en los TIL descongelados en comparación con los TIL frescos. En algunas formas de realización, no hay una diferencia significativa en la expresión de CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$. En algunas formas de realización, no hay una diferencia significativa en la expresión de CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ y/o marcadores de memoria en TIL frescos en comparación con TIL descongelados.

En algunas formas de realización, el marcador de memoria se selecciona del grupo que consiste en CCR7 y CD62L.

En algunas formas de realización, la viabilidad de los TIL frescos en comparación con los TIL descongelados es al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos el 98%. En algunas formas de realización, la viabilidad de los TIL tanto frescos como descongelados es mayor al 70%, mayor al 75%, mayor al 80%, mayor al 85%, mayor al 90%, mayor al 95% o mayor al 98%. En algunas formas de realización, la viabilidad tanto del producto fresco como descongelado es mayor al 80%, mayor al 81%, mayor al 82%, mayor al 83%, mayor al 84%, mayor al 85%, mayor al 86%, mayor al 87%, mayor al 88%, mayor al 89% o mayor al 90%. En algunas formas de realización, la viabilidad del producto tanto fresco como descongelado es mayor al 86%.

En una forma de realización, los TIL reestimulados también pueden evaluarse para la liberación de citocinas, usando ensayos de liberación de citocinas. En algunas formas de realización, los TIL pueden evaluarse para la secreción de interferón-7 (IFN-7) en respuesta a la estimulación con OKT3 o cocultivo con digestión de tumor autólogo. Por ejemplo, en las formas de realización que emplean estimulación con OKT3, los TIL se lavan extensamente y se preparan pocillos duplicados con 1×10^5 células en 0.2 ml de CM en placas de fondo plano de 96 pocillos recubiertas previamente con 0.1 o 1.0 $\mu\text{g/ml}$ de OKT3 diluido en solución salina con pH regulado con fosfato. Después de la incubación durante la noche, se recogen los sobrenadantes y se mide el IFN-7 en el sobrenadante mediante ELISA (Pierce/Endogen, Woburn, MA). Para el ensayo de cocultivo, se colocan 1×10^5 células TIL en una placa de 96 pocillos con células tumorales autólogas. (Relación 1:1). Después de una incubación de 24 horas, se recogen los sobrenadantes y se puede cuantificar la liberación de IFN-7, por ejemplo, mediante ELISA.

En algunas formas de realización, la caracterización fenotípica se examina después de la crioconservación.

J. Salud metabólica de los TIL expandidos

Los TIL reestimulados se caracterizan por una mejora significativa de la glucólisis basal en comparación con los TIL recién recolectados y/o los TIL post-descongelados. En una forma de realización, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL, la población de TIL recolectada y/o la población de TIL terapéutica basada en la expresión de CD8 durante ninguna de las etapas, incluidas las discutidas anteriormente o como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL basada en la expresión de CD8. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la segunda población de TIL basada en la expresión de CD8. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la tercera población de TIL basada en la expresión de CD8. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la población recolectada de TIL basada en la expresión de CD8. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la población terapéutica de TIL basada en la expresión de CD8.

En un ejemplo, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL o la población de TIL recolectada basada en la expresión de CD8 durante ninguna de las etapas (a) a (f) del procedimiento para expandir los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende:

(a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un paciente convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor;

(b) agregar los fragmentos de tumor a un sistema cerrado;

5 (c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;

10 (d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la
15 segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;

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

20 (f) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (e) a una bolsa de infusión, en donde la transferencia de la etapa (e) a la (f) ocurre sin abrir el sistema.

En un ejemplo, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL o la población de TIL recolectada basada en la expresión de CD8 durante ninguna de las etapas (a) a (h) del procedimiento. para el tratamiento de un sujeto con cáncer; el procedimiento comprende
25 administrar linfocitos infiltrantes de tumores expandidos (TIL) y comprende:

(a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor;

(b) agregar los fragmentos de tumor a un sistema cerrado;

30 (c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;

35 (d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la
40 segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;

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

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

(g) opcionalmente crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada de la etapa (f) usando un procedimiento de crioconservación; y

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

Los TIL preparados mediante los procedimientos descritos en este documento se caracterizan por una mejora significativa de la glucólisis basal en comparación con, por ejemplo, los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos a los que se proporcionan en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En una forma de realización, no se

realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL, la población de TIL recolectada y/o la población de TIL terapéutica basada en la expresión de CD8 durante ninguna de las etapas, incluidas las discutidas anteriormente o como se proporcionan, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL basada en la expresión de CD8. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la segunda población de TIL basada en la expresión de CD8. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la tercera población de TIL basada en la expresión de CD8. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la población recolectada de TIL basada en la expresión de CD8. En algunas formas de realización, no se realiza ninguna selección de la población terapéutica de TIL basada en la expresión de CD8. En una forma de realización, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL o la población de TIL recolectada basada en la expresión de CD8 durante ninguna de las etapas (a) a (h).

La capacidad respiratoria de reserva (SRC) y la reserva glucolítica pueden evaluarse para los TIL expandidos con diferentes procedimientos de la presente divulgación. La prueba de estrés Seahorse XF Cell Mito mide la función mitocondrial midiendo directamente la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células, utilizando moduladores de la respiración que se dirigen a los componentes de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias. Los compuestos de prueba (oligomicina, FCCP y una mezcla de rotenona y antimicina A, descritos más adelante) se inyectan en serie para medir la producción de ATP, la respiración máxima y la respiración no mitocondrial, respectivamente. Más adelante, se calculan la fuga de protones y la capacidad respiratoria de reserva utilizando estos parámetros y la respiración basal. Cada modulador se dirige a un componente específico de la cadena de transporte de electrones. La oligomicina inhibe la ATP sintasa (complejo V) y la disminución de OCR después de la inyección de oligomicina se correlaciona con la respiración mitocondrial asociada con la producción de ATP celular. El carbonilcianuro-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) es un agente desacoplador que colapsa el gradiente de protones y altera el potencial de la membrana mitocondrial. Como resultado, el flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones se desinhibe y el complejo IV consume al máximo el oxígeno. El OCR estimulado por FCCP se puede utilizar para calcular la capacidad respiratoria de reserva, definida como la diferencia entre la respiración máxima y la respiración basal. La capacidad respiratoria de reserva (SRC) es una medida de la capacidad de la célula para responder al aumento de la demanda de energía. La tercera inyección es una mezcla de rotenona, un inhibidor del complejo I, y antimicina A, un inhibidor del complejo III. Esta combinación detiene la respiración mitocondrial y permite el cálculo de la respiración no mitocondrial impulsada por procesos fuera de las mitocondrias. En algunas formas de realización, la comparación es, por ejemplo, con TIL recién recolectados y/o TIL preparados usando otros procedimientos distintos a los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados a la Figura 27.

En algunas formas de realización, el ensayo metabólico es la respiración basal. En general, los TIL de segunda expansión tienen una tasa de respiración basal de al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de la tasa de respiración basal de TIL recién recolectados y/o TIL recién preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento incluyendo, por ejemplo, procedimientos distintos a los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la tasa de respiración basal es de alrededor de el 50% a alrededor de el 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados utilizando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la tasa de respiración basal es de alrededor del 60% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la tasa de respiración basal es de alrededor del 70% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la tasa de respiración basal es de alrededor del 80% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados utilizando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la tasa de respiración basal es de alrededor del 90% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la tasa de respiración basal es de alrededor del 95% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos que los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen una tasa de respiración basal que no es estadísticamente significativa distinto de la tasa de respiración basal de TIL recién recolectados y/o TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluidos,

por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la comparación es, por ejemplo, con TIL recién recolectados y/o TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados a la Figura 27.

En algunas formas de realización, el ensayo metabólico es capacidad respiratoria de reserva. En general, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen una capacidad respiratoria de reserva que es al menos del 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la capacidad respiratoria de reserva es de alrededor del 50% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados. En algunas formas de realización, la capacidad respiratoria de reserva es de alrededor del 50% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la capacidad respiratoria de reserva es de alrededor del 60% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o TIL preparados utilizando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la capacidad respiratoria de reserva es de alrededor del 70% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados utilizando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la capacidad respiratoria de reserva es de alrededor de un 80% a alrededor de un 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados. En algunas formas de realización, la capacidad respiratoria de reserva es de alrededor de 90% a alrededor de 99% de la tasa de respiración basal de TIL recién recolectados y/o TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la capacidad respiratoria de reserva es de alrededor del 95% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados utilizando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen una capacidad respiratoria de reserva que no es diferente de manera estadísticamente significativa de la tasa de respiración basal de TIL recién recolectados y/o TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27.

En general, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen una capacidad respiratoria de reserva que es al menos de al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de la tasa de respiración basal de TIL recién recolectados y/o TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento incluyendo, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el ensayo metabólico medido es la reserva glucolítica. En algunas formas de realización, el ensayo metabólico es capacidad respiratoria de reserva. Para medir el metabolismo celular (respiratorio), las células se trataron con inhibidores de la respiración mitocondrial y la glucólisis para determinar un perfil metabólico para el TIL que consta de las siguientes medidas: fosforilación oxidativa basal (medida por OCR), capacidad respiratoria de reserva, actividad glucolítica de línea base (como se mide por ECAR) y reserva glucolítica. Los perfiles metabólicos se realizaron utilizando el Ensayo de Prueba de Estrés de Glicólisis/Mitocondrial Combinado Seahorse (incluido el kit disponible comercialmente en Agilent®), que permite determinar la capacidad de las células para realizar glucólisis tras el bloqueo de la producción de ATP mitocondrial. En algunas formas de realización, las células carecen de glucosa, luego se inyecta glucosa, seguida de un agente de estrés. En algunas formas de realización, el agente de estrés se selecciona del grupo que consiste en oligomicina, FCCP, rotenona, antimicina A y/o 2-desoxiglucosa (2-DG), así como combinaciones de las mismas. En algunas formas de realización, se agrega oligomicina a 10 mM. En algunas formas de realización, se agrega FCCP a 10 mM. En algunas formas de realización, se agrega rotenona a 2.5 mM. En algunas formas de realización, se agrega antimicina A a 2.5 mM. En algunas formas de realización, se agrega 2-desoxiglucosa (2-DG) a 500 mM. En algunas formas de realización, se miden la capacidad glucolítica, la reserva glucolítica y/o la acidificación no glucolítica. En general, los TIL tienen una reserva glucolítica de al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados utilizando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas

formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor del 50% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor del 60% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor de un 70% a alrededor de un 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor de un 80% a alrededor de un 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor del 90% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor del 95% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27.

En algunas formas de realización, el ensayo metabólico es la glucólisis basal. En algunas formas de realización, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen un aumento en la glucólisis basal de al menos dos veces, de al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos 7 veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces o al menos diez veces en comparación con TIL recién recolectados y/o TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (tales como, por ejemplo, las descritas en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen un aumento en la glucólisis basal de alrededor de dos veces a alrededor de diez veces en comparación con los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (tales como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen un aumento en la glucólisis basal de alrededor de dos veces a alrededor de ocho veces en comparación con los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL de la segunda expansión o los TIL de la segunda expansión adicional (como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen un aumento en la glucólisis basal de alrededor de tres veces a alrededor de siete veces en comparación con los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (tales como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen un aumento en la glucólisis basal de alrededor de dos veces a alrededor de cuatro veces en comparación con los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (tales como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen un aumento en la glucólisis basal de alrededor de dos veces a alrededor de tres veces en comparación con los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27.

En general, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen una reserva glucolítica de al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor del 50% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor del 60% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos

distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor de un 70% a alrededor de un 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor de un 80% a alrededor de un 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor del 90% a alrededor del 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados y/o TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la reserva glucolítica es de alrededor de un 95% a alrededor de un 99% de la tasa de respiración basal de los TIL recién recolectados.

Producción de granzima B: la granzima B es otra medida de la capacidad de TIL para destruir células diana. Los sobrenadantes de los medios reestimulados como se describió anteriormente usando anticuerpos para CD3, CD28 y CD137/4-1BB también se evaluaron para sus niveles de Granzima B usando el Kit ELISA Human Granzyme B DuoSet (R & D Systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunas formas de realización, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (tales como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) han aumentado la producción de Granzima B. En algunas formas de realización, los TIL de segunda expansión o los TIL de segunda expansión adicional (tales como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 27, incluidos los TIL denominados reREP TIL) tienen una actividad citotóxica aumentada.

En algunas formas de realización, la longitud de los telómeros se puede usar como una medida de la viabilidad celular y/o función celular. En algunas formas de realización, los telómeros tienen sorprendentemente la misma longitud en los TIL producidos por la presente invención en comparación con los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. Medición de la longitud de los telómeros: se han utilizado diversos procedimientos para medir la longitud de los telómeros en preparaciones citológicas y de ADN genómico. El análisis de fragmentos de restricción de telómeros (TRF) es el estándar de oro para medir la longitud de los telómeros (de Lange et al., 1990). Sin embargo, la principal limitación de TRF es el requisito de una gran cantidad de ADN (1,5 μ g). Con la presente invención se pueden emplear dos técnicas ampliamente utilizadas para la medición de la longitud de los telómeros, a saber, la hibridación de fluorescencia in situ (FISH; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y la PCR cuantitativa. En algunas formas de realización, no hay cambio en la longitud de los telómeros entre los TIL inicialmente recolectados en la etapa A y los TIL expandidos de, por ejemplo, la etapa D como se proporciona en la Figura 27.

En algunas formas de realización, la salud de TIL se mide mediante la secreción de IFN-gamma (IFN- γ). En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ es indicativa de TIL activos. En algunas formas de realización, se emplea un ensayo de potencia para la producción de IFN- γ . La producción de IFN- γ es otra medida del potencial citotóxico. La producción de IFN- γ puede medirse determinando los niveles de la citocina IFN- γ en el medio de TIL estimulado con anticuerpos a CD3, CD28 y CD137/4-1BB. Los niveles de IFN γ en los medios de estos TIL estimulados pueden determinarse midiendo la liberación de IFN- γ . En algunas formas de realización, un aumento en la producción de IFN- γ en, por ejemplo, TIL de la etapa D como se proporciona en la Figura 27 en comparación con los TIL recolectados inicialmente en, por ejemplo, la etapa A como se proporciona en la Figura 27, es indicativo de un aumento en el potencial citotóxico de TIL de la etapa D. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta una, dos, tres, cuatro o cinco veces o más. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta una vez. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta al doble. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ se triplica. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta cuatro veces. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta cinco veces. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide usando un kit de ELISA Quantikine. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide en TIL ex vivo. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide en TIL ex vivo, incluidos los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención, incluidos, por ejemplo, los procedimientos de la Figura 27, así como los TIL recién recolectados o los TIL producidos por otros procedimientos, como los proporcionados, por ejemplo, en la Figura 83 (como, por ejemplo, el procedimiento 1C TIL).

En algunas formas de realización, el potencial citotóxico de TIL para lisar células diana se evaluó usando un ensayo de cocultivo de TIL con la línea celular bioluminiscente, P815 (Clon G6), de acuerdo con un ensayo de lisis redirigida bioluminiscente (ensayo de potencia) para ensayo de TIL que mide la citotoxicidad de TIL de una manera dependiente de la dosis altamente sensible.

En algunas formas de realización, los presentes procedimientos proporcionan un ensayo para evaluar la viabilidad de TIL, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. En algunas formas de realización, los TIL se expanden como se discutió anteriormente, incluyendo, por ejemplo, lo que se proporciona en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL se criopreservan antes de evaluar su viabilidad. En algunas formas de realización, la evaluación de viabilidad incluye descongelar los TIL antes de realizar una primera

expansión, una segunda expansión y una segunda expansión adicional. En algunas formas de realización, los presentes procedimientos proporcionan un ensayo para evaluar la proliferación celular, la toxicidad celular, la muerte celular y/u otros términos relacionados con la viabilidad de la población de TIL. La viabilidad se puede medir mediante cualquiera de los ensayos metabólicos de TIL descritos anteriormente, así como con cualquier procedimiento conocido para evaluar la viabilidad celular que se conoce en la técnica. En algunas formas de realización, los presentes procedimientos proporcionan un ensayo para la evaluación de la proliferación celular, toxicidad celular, muerte celular y/u otros términos relacionados con la viabilidad de los TIL expandidos usando los procedimientos descritos en este documento, incluidos los ejemplificados en la Figura 27.

También se divulgan en el presente documento, pero no se reivindican, procedimientos de ensayo para determinar la viabilidad de TIL. En algunas formas de realización, los TIL tienen la misma viabilidad en comparación con los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL tienen una viabilidad incrementada en comparación con los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. La presente divulgación proporciona procedimientos para analizar la viabilidad de TIL mediante la expansión de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) a una población más grande de TIL, que comprende:

(i) obtención de una primera población de TIL previamente expandida;

(ii) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL; y

(iii) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es al menos 100 veces mayor que la segunda población de TIL, y en donde la segunda expansión se realiza durante al menos 14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, y en las que la tercera población se analiza adicionalmente para determinar su viabilidad.

El procedimiento puede comprender, además:

(iv) realizar una segunda expansión adicional suplementando el medio de cultivo celular de la tercera población de TIL con IL-2 adicional, OKT-3 adicional y APC adicionales, en donde la segunda expansión adicional se realiza durante al menos 14 días para obtener una mayor población de TIL que la obtenida en la etapa (iii), en donde la población más grande de TIL comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la tercera población de TIL, y en donde la tercera población se analiza adicionalmente para viabilidad.

Antes de la etapa (i), las células se pueden crioconservar.

Las células T se pueden descongelar antes de realizar la etapa (i).

La etapa (iv) se puede repetir de una a cuatro veces con el fin de obtener suficientes TIL para el análisis.

Las etapas (i) a (iii) o (iv) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 40 días a alrededor de 50 días.

Las etapas (i) a (iii) o (iv) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 42 días a alrededor de 48 días.

Las etapas (i) a (iii) o (iv) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 42 días a alrededor de 45 días.

Las etapas (i) a (iii) o (iv) se pueden realizar en alrededor de 44 días.

Las células de las etapas (iii) o (iv) pueden expresar CD4, CD8 y TCR α β a niveles similares a las células recién recolectadas.

Las células presentadoras de antígeno pueden ser células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Las PBMC se pueden agregar al cultivo celular en cualquiera de los días 9 a 17 en la etapa (iii).

Las células T efectoras y/o las células T de memoria central en la población más grande de TIL en la etapa (iv) pueden exhibir una o más características seleccionadas del grupo que consiste en expresión de CD27, expresión de CD28, telómeros más largos, expresión aumentada de CD57 y expresión disminuida de CD56, en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central en la tercera población de células.

Las células T efectoras y/o las células T de memoria central pueden exhibir una expresión de CD57 aumentada y una expresión de CD56 disminuida.

Las APC pueden ser APC artificiales (aAPC).

5 El procedimiento puede comprender además la etapa de transducción de la primera población de TIL con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de células T de alta afinidad.

La etapa de transducción puede ocurrir antes de la etapa (i).

10 El procedimiento puede comprender además la etapa de transducción de la primera población de 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 única fusionado con al menos un endodominio de una molécula de señalización de célula T.

La etapa de transducción puede ocurrir antes de la etapa (i).

Se puede ensayar la viabilidad de los TIL.

Se puede analizar la viabilidad de los TIL después de la crioconservación.

Se puede analizar la viabilidad de los TIL después de la crioconservación y después de la etapa (iv).

15 Los diversos receptores de antígenos de los linfocitos T y B se producen por recombinación somática de un número limitado, pero grande, de segmentos de gen. Estos segmentos de genes: V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante), determinan la especificidad de enlace y las aplicaciones posteriores de inmunoglobulinas y receptores de células T (TCR). La presente invención proporciona un procedimiento para generar TIL que exhiben y aumentan la diversidad del repertorio de células T (a veces denominado policlonalidad). En algunas formas de realización, el aumento en la diversidad del repertorio de células T se compara con los TIL recién recolectados y/o los TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos por el presente procedimiento exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos en la primera expansión exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas formas de realización, el aumento de la diversidad es un aumento de la diversidad de inmunoglobulinas y/o la diversidad del receptor de células T. En algunas formas de realización, la diversidad está en la inmunoglobulina; está en la cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la diversidad está en la inmunoglobulina; está en la cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la diversidad está en el receptor de células T. En algunas formas de realización, la diversidad está en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma y delta. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas formas de realización, hay un aumento en la expresión de TCRab (es decir, TCR α/β).

De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para analizar la viabilidad de los TIL y/o su uso adicional en la administración a un sujeto. El procedimiento para analizar los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) puede comprender:

(i) obtener una primera población de TIL;

40 (ii) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL; y

(iii) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la segunda población de TIL;

(iv) recolección, lavado y crioconservación de la tercera población de TIL;

(v) almacenar los TIL crioconservados a una temperatura criogénica;

(vi) descongelar la tercera población de TIL para proporcionar una tercera población descongelada de TIL; y

50 (vii) realizar una segunda expansión adicional de una porción de la tercera población descongelada de TIL suplementando el medio de cultivo celular de la tercera población con IL-2, OKT-3 y APC durante un período de expansión adicional (a veces denominado período reREP) de al menos 3 días, en donde la tercera expansión

se realiza para obtener una cuarta población de TIL, en donde el número de TIL en la cuarta población de TIL se compara con el número de TIL en la tercera población de TIL para obtener una relación;

(viii) determinar basándose en la relación en la etapa (vii) si la población descongelada de TIL es adecuada para la administración a un paciente;

- 5 (ix) administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la tercera población descongelada de TIL al paciente cuando se determina que la relación entre el número de TIL en la cuarta población de TIL y el número de TIL en la tercera población de TIL es superior a 5:1 en la etapa (viii).

10 El período de expansión adicional (a veces denominado período reREP) se puede realizar hasta que la relación entre el número de TIL en la cuarta población de TIL y el número de TIL en la tercera población de TIL sea mayor que 50:1.

El número de TIL suficientes para una dosificación terapéuticamente eficaz puede ser de alrededor de 2.3×10^{10} a alrededor de 13.7×10^{10} .

15 Las etapas (i) a (vii) se realizan dentro de un período de alrededor de 40 días a alrededor de 50 días. Las etapas (i) a (vii) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 42 días a alrededor de 48 días. Las etapas (i) a (vii) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 42 días a alrededor de 45 días. Las etapas (i) a (vii) se pueden realizar en alrededor de 44 días.

Las células de las etapas (iii) o (vii) pueden expresar CD4, CD8 y TCR $\alpha \beta$ a niveles similares a las células recién recolectadas. Las células pueden ser TIL.

20 Las células presentadoras de antígeno pueden ser células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC se pueden agregar al cultivo celular en cualquiera de los días 9 a 17 en la etapa (iii).

25 Las células T efectoras y/o las células T de memoria central en la población más grande de TIL en las etapas (iii) o (vii) pueden exhibir una o más características seleccionadas del grupo que consiste en expresión de CD27, expresión de CD28, telómeros más largos, aumento de la expresión de CD57 y disminución de la expresión de CD56, en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central en la tercera población de células.

Las células T efectoras y/o las células T de memoria central pueden exhibir una expresión de CD57 aumentada y una expresión de CD56 disminuida.

Las APC pueden ser APC artificiales (aAPC).

30 La etapa de transducción de la primera población de TIL con un vector de expresión puede comprender un ácido nucleico que codifica un receptor de células T de alta afinidad.

La etapa de transducción puede ocurrir antes de la etapa (i).

35 La etapa de transducción de la primera población de TIL con un vector de expresión puede comprender un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un anticuerpo de fragmento variable de cadena única fusionado con al menos un endodominio de una molécula de señalización de células T.

La etapa de transducción puede ocurrir antes de la etapa (i).

Se puede analizar la viabilidad de los TIL después de la etapa (vii).

La presente divulgación también proporciona procedimientos adicionales para analizar TIL. La divulgación puede proporcionar un procedimiento para analizar TIL que comprende:

- 40 (i) obtener una porción de una primera población de TIL criopreservados;
(ii) descongelar la porción de la primera población de TIL criopreservados;

45 (iii) realizar una primera expansión cultivando la porción de la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) durante un período de expansión adicional (a veces denominado período de reREP) de al menos 3 días, para producir una segunda población de TIL, en donde la porción de la primera población de TIL se compara con la segunda población de TIL para obtener una relación del número de TIL, donde la relación del número de TIL en la segunda población de TIL al número de TIL en la porción de la primera población de TIL es mayor que 5:1;

(iv) determinar basándose en la relación en la etapa (iii) si la primera población de TIL es adecuada para su uso en la administración terapéutica a un paciente;

(v) la determinación de la primera población de TIL es adecuada para su uso en la administración terapéutica cuando se determina que la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es superior a 5:1 en la etapa (iv).

5 La relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la porción de la primera población de TIL puede ser superior a 50:1.

El procedimiento puede comprender además realizar la expansión de la primera población completa de TIL criopreservados de la etapa (i) según los procedimientos descritos en cualquiera de las formas de realización proporcionadas en el presente documento.

10 El procedimiento puede comprender además administrar la primera población completa de TIL criopreservados desde la etapa (i) al paciente.

K. Sistemas cerrados para la fabricación de TIL

15 La presente invención proporciona el uso de sistemas cerrados durante el procedimiento de cultivo de TIL. Dichos sistemas cerrados permiten prevenir y/o reducir la contaminación microbiana, permiten el uso de menos matraces y permiten reducir los costes. En algunas formas de realización, el sistema cerrado usa dos contenedores.

Estos sistemas cerrados son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> y <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>.

20 Como se proporciona en el sitio web de la FDA, los sistemas cerrados con procedimientos estériles son conocidos y están bien descritos. Véase <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>, como se menciona anteriormente y se proporciona en la parte pertinente más adelante.

25 Los dispositivos de conexión estériles (STCD) producen soldaduras estériles entre dos piezas de tubería compatible. Este procedimiento permite la conexión estéril de una variedad de recipientes y diámetros de tubo. Esta guía describe las prácticas y los procedimientos recomendados para el uso de estos dispositivos. Esta guía no aborda los datos o la información que un fabricante de un dispositivo de conexión estéril debe enviar a la FDA para obtener la aprobación o autorización para su comercialización. También es importante tener en cuenta que el uso de un dispositivo de conexión estéril aprobado o autorizado para fines no autorizados en el etiquetado puede hacer que el dispositivo se considere adulterado y etiquetado incorrectamente según la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos.

1. Recomendaciones de la FDA

35 Los fabricantes de productos sanguíneos que proponen usar rutinariamente un STCD autorizado por la FDA deberían incorporar información sobre dicho uso en los manuales de procedimientos operativos estándar (POE) para cada producto sanguíneo. Estas entradas deben incluir mantenimiento de registros, seguimiento de productos, control de calidad de soldadura de tubos, números de lote de software y desechables (incluidas las fuentes de los elementos que se agregarán). Los procedimientos de control de calidad deben incluir una prueba de la integridad de cada soldadura.

40 2. Aplicaciones del STCD

45 El usuario debe ser consciente de que el uso del dispositivo puede crear un nuevo producto o modificar significativamente la configuración de un producto regulado para el que no se ha demostrado seguridad y eficacia. Para aquellos "nuevos productos" sujetos a licencia, las solicitudes o suplementos de solicitud deben enviarse a la FDA además de la presentación de un POE. En general, la combinación o mezcla que involucra componentes celulares representa un cambio en el producto que requiere la presentación y aprobación de una solicitud de licencia o un suplemento de solicitud. Dichas aplicaciones y suplementos de aplicación deben contener datos y descripciones de los procedimientos de fabricación que demuestren que el "nuevo producto" es seguro y eficaz para el uso previsto durante el período de datación propuesto.

50 Los siguientes comentarios se proporcionan como orientación sobre los usos más comunes de una STCD autorizada o aprobada por la FDA:

L. Agregar una aguja nueva o más pequeña a un equipo de extracción de sangre

No se considera que el uso del STCD para agregar una aguja antes del inicio de un procedimiento (extracción de sangre entera, plaquetaféresis o recolección de plasma fuente) abra un sistema funcionalmente cerrado. Si se agrega una aguja durante un procedimiento, solo se debe usar un STCD aprobado para soldar tubos llenos

de líquido. Si la prueba de integridad de la soldadura es satisfactoria, no se considera que el uso de un STCD abra un sistema funcionalmente cerrado.

- 5 Las plaquetas, la feresis preparada en un sistema abierto deben etiquetarse con una fecha de vencimiento de 24 horas y las plaquetas, los productos de feresis preparados en un sistema funcionalmente cerrado deben etiquetarse con una fecha de vencimiento de cinco días (véase Revised Guideline for Collection of Platelets, Pheresis, October 7, 1988).

La fuente y las especificaciones de los tubos y agujas añadidos deben abordarse en los POE y los registros del centro de sangre. El uso del STCD para agregar agujas no representa un cambio importante en la fabricación para el cual los establecimientos autorizados necesitan aprobación previa.

10 M. Uso del STCD para preparar componentes

Cuando se usa el STCD para unir bolsas de preparación de componentes adicionales, se deben mantener registros de modo apropiado identificando la fuente de los paquetes de transferencia y la verificación apropiada del número de unidad de sangre y ABO/Rh. Toda la sangre y los componentes sanguíneos deben estar debidamente etiquetados (21 CFR 606.121).

15 Ejemplos:

- Adición de una cuarta bolsa a un paquete triple de recolección de sangre entera para la producción de AHF crioprecipitado a partir de plasma fresco congelado.
 - Conexión de una solución aditiva a una unidad de glóbulos rojos.
 - Adición de un filtro en línea que ha sido aprobado por la FDA para su uso en la fabricación de componentes.
- 20
- Adición de un tercer contenedor de almacenamiento a un arnés de plaquetaféresis.
 - Para los usos indicados anteriormente, se deben desarrollar procedimientos y mantener registros, pero los titulares de licencias no necesitan la aprobación de la FDA para establecer los procedimientos.

1. Uso del STCD para agrupar productos hemoderivados

- 25 El uso apropiado de un STCD para agrupar las plaquetas preparadas a partir de la extracción de sangre entera puede evitar la contaminación potencial de las entradas de intensificación y puertos que se usan comúnmente. La combinación realizada inmediatamente antes de la transfusión es un ejemplo de este uso apropiado. Las plaquetas combinadas deben administrarse no más de 4 horas después de la combinación (véase 21 CFR 606.122 (1) (2)).

- 30 Sin embargo, la combinación y el almacenamiento posterior pueden aumentar el riesgo en comparación con la administración de unidades de donantes al azar; si una unidad contaminada se combina con otras y se almacena antes de la administración, el inóculo bacteriano total administrado puede aumentar como resultado de la replicación en el volumen adicional. Por consiguiente, el uso propuesto de un STCD para agrupar y almacenar plaquetas durante más de 4 horas debería estar respaldado por datos que aborden satisfactoriamente si tal agrupación está asociada con un mayor riesgo.

- 35 Tal agrupación de plaquetas constituye la fabricación de un nuevo producto.

El agrupamiento o mezcla que involucra plaquetas se considera la fabricación de un nuevo producto que requiere la presentación y aprobación de una solicitud de licencia o suplemento de solicitud si el período de almacenamiento debe exceder las cuatro horas.

2. Uso del STCD para preparar una alícuota para uso pediátrico y unidades divididas

- 40 Las unidades pediátricas y las unidades divididas de sangre entera, glóbulos rojos y plasma fresco congelado preparadas con un STCD no se considerarán un producto nuevo para el que se requiere un suplemento de solicitud de licencia biológica (BLA) siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

El fabricante debe tener una licencia biológica aprobada o un suplemento de licencia para el producto original (es decir, no dividido), incluida la aprobación de cada anticoagulante utilizado.

- 45 Las etiquetas deben enviarse para su revisión y aprobación antes de su distribución. Se debe hacer una anotación en la sección de comentarios del Formulario 2567 de la FDA, Transmisión de etiquetas y circulares.

Deben utilizarse envases de producto final aprobados para el almacenamiento del componente que se está preparando.

Las plaquetas fabricadas bajo licencia deben contener al menos $5.5 \times (10)^{10}$ plaquetas (21 CFR 640.24 (c)). Plaquetas, fésis fabricada bajo licencia debe contener al menos $3.0 \times (10)^{11}$ plaquetas (véase Revised Guideline for the Collection of Platelets, Pheresis, October 7, 1988).

5 Los procedimientos a seguir con respecto al uso de un STCD para preparar productos divididos de recolecciones de sangre entera y de plasma y plaquetas preparados mediante procedimientos de hemaféresis automatizados deben incluir descripciones de:

- cómo se modificará el arnés de aféresis o el recipiente de recolección con un STCD aprobado por la FDA;
- el volumen mínimo del plasma fraccionado o de los productos hemoderivados;
- el volumen y la concentración de plaquetas de los productos de plaquetaféresis dividida;

10 • tiempo de almacenamiento del producto. El producto debe estar en un recipiente aprobado y debe ser consistente con el tiempo de almacenamiento que figura en la etiqueta de dicho recipiente;

• procedimiento (s) que se utilizarán para etiquetar y rastrear productos divididos en los registros del centro de sangre.

15 NOTA: Los procedimientos para etiquetar las alícuotas deben establecerse claramente en el procedimiento, el mantenimiento de registros debe ser adecuado para permitir el seguimiento y la retirada de todos los componentes, si es necesario.

3. Uso de un STCD para conectar líneas adicionales de solución salina o anticoagulante durante un procedimiento de plasmaféresis automatizado

20 Se deben desarrollar procedimientos y mantener registros consistentes con las instrucciones de uso del fabricante del instrumento, pero los titulares de licencia no necesitan tener la aprobación de la FDA para establecer los procedimientos.

4. Uso del STCD para adjuntar soluciones de tratamiento

25 Cuando se usa un STCD para unir contenedores con soluciones de tratamiento a productos de glóbulos rojos lavados o congelados, el período de datación para los productos resultantes es de 24 horas, a menos que los datos se proporcionen en forma de solicitudes de licencia o suplementos de solicitud al CBER para respaldar un período de datación más largo (21 CFR 610.53 (c)). Las exenciones o modificaciones deben ser aprobadas por escrito por el Director, CBER (21 CFR 610.53 (d)).

5. Uso de un STCD para agregar un filtro de reducción de leucocitos aprobado por la FDA

30 Algunos filtros de leuco-reducción no están unidos integralmente a los sistemas de recolección de sangre entera. Los procedimientos de uso de un STCD para la filtración previa al almacenamiento deben ser consistentes con las instrucciones de uso de los fabricantes de filtros.

35 La reducción de leucocitos antes de la emisión constituye un cambio de fabricación importante. Por lo tanto, para los nuevos productos con contenido reducido de leucocitos preparados con un STCD, los fabricantes deben presentar solicitudes de licencia de productos biológicos (21 CFR 601.2) o suplementos de solicitud de aprobación previa a la FDA (21 CFR 601.12).

Usar un STCD para extraer muestras de recipientes de productos sanguíneos para su análisis (por ejemplo, usar un STCD para obtener una muestra de plaquetas de un recipiente de plaquetas o plaquetas, fésis para comparación cruzada).

40 Si el volumen y/o recuento de células del producto después de la extracción de la muestra difieren de lo que se indica en la etiqueta original o en la circular de información, la etiqueta del producto debe modificarse para reflejar el nuevo volumen y/o recuento celular. Por ejemplo, es posible que no se extraigan muestras que reduzcan el recuento de plaquetas de una unidad de plaquetas a menos de $5.5 \times (10)^{10}$ plaquetas (21 CFR 640.24 (c)).

6. Información adicional de la guía de la FDA

45 La guía de la FDA presenta una guía general, así como información específica y ejemplos relacionados con las especificaciones para la presentación de solicitudes y suplementos de solicitud a la FDA que abordan el uso de un STCD. Si surgen más preguntas sobre el uso apropiado de un STCD, las inquietudes deben dirigirse a la Oficina de Investigación y Revisión de Sangre, Centro de Evaluación e Investigación Biológica.

50 En algunas formas de realización, el sistema cerrado usa un recipiente desde el momento en que se obtienen los fragmentos tumorales hasta que los TIL están listos para la administración al paciente o la crioconservación.

En algunas formas de realización, cuando se utilizan dos recipientes, el primer recipiente es un recipiente G cerrado y la población de TIL se centrifuga y se transfiere a una bolsa de infusión sin abrir el primer recipiente G cerrado. En algunas formas de realización, cuando se utilizan dos recipientes, la bolsa de infusión es una bolsa de infusión que contiene HypoThermosol. Un sistema cerrado o un sistema de cultivo de células TIL cerrado se caracteriza porque una vez que se han agregado la muestra del tumor y/o los fragmentos del tumor, el sistema se sella herméticamente desde el exterior para formar un ambiente cerrado libre de la invasión de bacterias, hongos y/o o cualquier otra contaminación microbiana.

En algunas formas de realización, la reducción de la contaminación microbiana está entre alrededor de un 5% y alrededor de un 100%. En algunas formas de realización, la reducción de la contaminación microbiana está entre alrededor de un 5% y alrededor de un 95%. En algunas formas de realización, la reducción de la contaminación microbiana está entre alrededor de un 5% y alrededor de un 90%. En algunas formas de realización, la reducción de la contaminación microbiana está entre alrededor de un 10% y alrededor de un 90%. En algunas formas de realización, la reducción de la contaminación microbiana está entre alrededor del 15% y alrededor del 85%. En algunas formas de realización, la reducción de la contaminación microbiana es alrededor del 5%, alrededor del 10%, alrededor del 15%, alrededor del 20%, alrededor del 25%, alrededor del 30%, alrededor del 35%, alrededor del 40%, alrededor del 45%, alrededor del 50%, alrededor del 55%, alrededor del 60%, alrededor del 65%, alrededor del 70%, alrededor del 75%, alrededor del 80%, alrededor del 85%, alrededor del 90%, alrededor del 95%, alrededor del 97%, alrededor del 98%, alrededor del 99% o alrededor de 100%.

El sistema cerrado permite el crecimiento de TIL en ausencia y/o con una reducción significativa de la contaminación microbiana.

Además, el pH, la presión parcial de dióxido de carbono y la presión parcial de oxígeno del entorno de cultivo de células TIL varían cada uno a medida que se cultivan las células. En consecuencia, aunque se haga circular un medio apropiado para el cultivo celular, el entorno cerrado todavía necesita mantenerse constantemente como un entorno óptimo para la proliferación de TIL. Para ello, es deseable que los factores físicos de pH, presión parcial de dióxido de carbono y presión parcial de oxígeno dentro del líquido de cultivo del ambiente cerrado sean monitoreados por medio de un sensor, cuya señal se utiliza para controlar un intercambiador de gas instalado en la entrada del entorno de cultivo y la presión parcial de ese gas del entorno cerrado se ajustan en tiempo real de acuerdo con los cambios en el líquido de cultivo para optimizar el entorno de cultivo celular. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un sistema de cultivo de células cerradas que incorpora en la entrada al ambiente cerrado un intercambiador de gas equipado con un dispositivo de monitoreo que mide el pH, la presión parcial de dióxido de carbono y la presión parcial de oxígeno del ambiente cerrado, y optimiza el entorno de cultivo celular ajustando automáticamente las concentraciones de gas en función de las señales del dispositivo de monitorización.

En algunas formas de realización, la presión dentro del entorno cerrado se controla de forma continua o intermitente. Es decir, la presión en el ambiente cerrado se puede variar por medio de un dispositivo de mantenimiento de presión, por ejemplo, asegurando así que el espacio sea adecuado para el crecimiento de TIL en un estado de presión positiva, o promoviendo la exudación de fluido en un estado de presión negativa y promoviendo así la proliferación celular. Aplicando presión negativa de manera intermitente, además, es posible reemplazar uniforme y eficientemente el líquido circulante en el ambiente cerrado por medio de una contracción temporal en el volumen del ambiente cerrado.

En algunas formas de realización, pueden sustituirse o agregarse componentes de cultivo óptimos para la proliferación de los TIL, y que incluyen factores tales como IL-2 y/o OKT3, así como puede agregarse una combinación.

C. Cultivos celulares

En una forma de realización, un procedimiento para expandir los TIL, incluidos los discutidos anteriormente y los ejemplificados en la Figura 27, puede incluir el uso de alrededor de 5,000 ml a alrededor de 25,000 ml de medio celular, alrededor de 5,000 ml a alrededor de 10,000 ml de medio celular, o alrededor de 5,800 ml a alrededor de 8,700 ml de medio celular. En algunas formas de realización, el medio es un medio sin suero, como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 21. En algunas formas de realización, el medio en la primera expansión está libre de suero. En algunas formas de realización, el medio en la segunda expansión está libre de suero. En algunas formas de realización, los medios de la primera expansión y la segunda están libres de suero. En una forma de realización, expandir el número de TIL no usa más de un tipo de medio de cultivo celular. Puede usarse cualquier medio de cultivo celular adecuado, por ejemplo, medio celular AIM-V (L-glutamina, sulfato de estreptomicina de 50 μ M y sulfato de gentamicina de 10 μ M) medio de cultivo celular (Invitrogen, Carlsbad CA). A este respecto, los procedimientos de la invención reducen ventajosamente la cantidad de medio y el número de tipos de medio requeridos para expandir el número de TIL. En una forma de realización, expandir el número de TIL puede comprender alimentar a las células con una frecuencia no mayor a cada tercer o cuarto día. La expansión del número de células en un recipiente permeable al gas simplifica los

procedimientos necesarios para expandir el número de células al reducir la frecuencia de alimentación necesaria para expandir las células.

En una forma de realización, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases no está filtrado. El uso de medio celular sin filtrar puede simplificar los procedimientos necesarios para expandir el número de células. En una forma de realización, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases carece de beta-mercaptoetanol (BME).

La duración del procedimiento que comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable al gas que contiene medio celular; obtener TIL de la muestra de tejido tumoral; expandir el número de TIL en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular puede ser de alrededor de 7 a 14 días, por ejemplo, alrededor de 11 días. En algunas formas de realización, el pre-REP puede ser de alrededor de 7 a 14 días, por ejemplo, alrededor de 11 días. En algunas formas de realización, REP es de alrededor de 7 a 14 días, por ejemplo, alrededor de 11 días.

En una forma de realización, los TIL se expanden en contenedores permeables a los gases. Se han utilizado recipientes permeables a los gases para expandir TIL utilizando PBMC, utilizando procedimientos, composiciones y dispositivos conocidos en la técnica, incluidos los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2005/0106717 A1. En una forma de realización, los TIL se expanden en bolsas permeables a los gases. En una forma de realización, los TIL se expanden utilizando un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables al gas, como el Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). En una forma de realización, los TIL se expanden usando un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables al gas, como el WAVE Bioreactor System, también conocido como Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). En una forma de realización, el sistema de expansión celular incluye una bolsa celular permeable a los gases con un volumen seleccionado del grupo que consta de alrededor de 100 ml, alrededor de 200 ml, alrededor de 300 ml, alrededor de 400 ml, alrededor de 500 ml, alrededor de 600 ml, alrededor de 700 ml, alrededor de 800 ml, alrededor de 900 ml, alrededor de 1 L, alrededor de 2 L, alrededor de 3 L, alrededor de 4 L, alrededor de 5 L, alrededor de 6 L, alrededor de 7 L, alrededor de 8 L, alrededor de 9 L y alrededor de 10 L.

En una forma de realización, los TIL se pueden expandir en matraces G-Rex (disponibles comercialmente en Wilson Wolf Manufacturing). Tales formas de realización permiten que las poblaciones de células se expandan desde alrededor de 5×10^5 células/cm² a entre 10×10^6 y 30×10^6 células/cm². En una forma de realización, esto es sin alimentación. En una forma de realización, esto es sin alimentación siempre que el medio resida a una altura de alrededor de 10 cm en el matraz G-Rex. En una forma de realización, esto es sin alimentación, pero con la adición de una o más citocinas. En una forma de realización, la citocina se puede agregar como un bolo sin necesidad de mezclar la citocina con el medio. Dichos contenedores, dispositivos y procedimientos son conocidos en la técnica y se han utilizado para expandir los TIL, e incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2014/0377739 A1, la publicación internacional No. WO 2014/210036 A1, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2013/0115617 A1, la publicación internacional No. WO 2013/188427 A1, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2011/0136228 A1, la patente de EE. UU. No. US 8,809,050 B2, la publicación internacional No. WO 2011/072088 A2, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2016/0208216 A1, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2012/0244133 A1, la publicación internacional No. WO 2012/129201 A1, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2013/0102075 A1, la patente de EE. UU. No. US 8,956,860 B2, la publicación internacional No. WO 2013/173835 A1, la publicación de solicitud de patente estadounidense No. US 2015/0175966 A1. Dichos procedimientos también se describen en Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35: 283-292.

D. Ingeniería genética opcional de TIL

En algunas formas de realización, opcionalmente los TIL se diseñan genéticamente para incluir funcionalidades adicionales que incluyen, entre otras, un receptor de células T de alta afinidad (TCR), por ejemplo, un TCR dirigido a un antígeno asociado a un tumor como MAGE-1, HER2 o NY-ESO-1, o un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a una molécula de superficie celular asociada a un tumor (por ejemplo, mesotelina) o una molécula de superficie celular de linaje restringido (por ejemplo, CD19).

E. Crioconservación opcional de TIL

Opcionalmente, se puede crioconservar o bien la población de TIL a granel o la población expandida de TIL. En algunas formas de realización, la crioconservación se produce en la población terapéutica de TIL. En algunas formas de realización, la crioconservación se produce en los TIL recolectados después de la segunda expansión. En algunas formas de realización, la crioconservación se produce en los TIL en la etapa F ejemplar de la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL se crioconservan en la bolsa de infusión. En algunas formas de realización, los TIL se crioconservan antes de colocarlos en una bolsa de infusión. En algunas formas de realización, los TIL se crioconservan y no se colocan en una bolsa de infusión. En algunas formas de realización, la crioconservación se realiza utilizando un medio de crioconservación. En algunas formas de

realización, el medio de criopreservación contiene dimetilsulfóxido (DMSO). Esto generalmente se logra poniendo la población de TIL en una solución de congelación, por ejemplo, 85% de suero AB inactivado con suplemento y 15% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las células en solución se colocan en viales criogénicos y se almacenan durante 24 horas a -80°C, con transferencia opcional a congeladores de nitrógeno gaseoso para criopreservación. Véase, Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986.

Cuando sea apropiado, las células se retiran del congelador y se descongelan en un baño de agua a 37°C hasta que se descongelan alrededor de 4/5 de la solución. Las células generalmente se resuspenden en medio completo y opcionalmente se lavan una o más veces. En algunas formas de realización, los TIL descongelados pueden contarse y evaluarse para determinar su viabilidad como se conoce en la técnica.

En una forma de realización preferida, una población de TIL se criopreserva usando medio de criopreservación CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). En una forma de realización preferida, una población de TIL se criopreserva usando un medio de criopreservación que contiene dimetilsulfóxido (DMSO). En una forma de realización preferida, una población de TIL se criopreserva usando una relación 1:1 (vol: vol) de CS 10 y medio de cultivo celular. En una forma de realización preferida, una población de TIL se criopreserva usando una relación de alrededor de 1:1 (vol: vol) de CS10 y medio de cultivo celular que comprende además IL-2 adicional.

Como se discutió anteriormente en las etapas A a E, la criopreservación puede ocurrir en numerosos puntos a lo largo del procedimiento de expansión de TIL. En algunas formas de realización, se pueden criopreservar la población de TIL a granel después de la primera expansión de acuerdo con la etapa B o la población expandida de TIL después de una o más segundas expansiones de acuerdo con la etapa D. La criopreservación generalmente se puede lograr colocando la población de TIL en una solución de congelación, por ejemplo, suero AB inactivado con suplemento al 85% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 15%. Las células en solución se colocan en viales criogénicos y se almacenan durante 24 horas a -80°C, con transferencia opcional a congeladores de nitrógeno gaseoso para criopreservación. Véase Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986.

Cuando sea apropiado, las células se retiran del congelador y se descongelan en un baño de agua a 37°C hasta que se descongelan alrededor de 4/5 de la solución. Las células generalmente se resuspenden en medio completo y opcionalmente se lavan una o más veces. En algunas formas de realización, los TIL descongelados pueden contarse y evaluarse para determinar su viabilidad, tal como se conoce en la técnica.

En algunos casos, la población de TIL de la Etapa B se puede criopreservar inmediatamente, utilizando los protocolos que se explican más adelante. Alternativamente, la población de TIL a granel puede someterse a la etapa C y a la etapa D y luego criopreservarse después de la etapa D. De manera similar, en el caso de que se utilicen TIL modificados genéticamente en terapia, las poblaciones de TIL de la etapa B o de la etapa D pueden someterse a modificaciones para tratamientos adecuados.

F. Análisis de viabilidad celular opcionales

Opcionalmente, se puede realizar un ensayo de viabilidad celular después de la primera expansión (a veces denominada expansión inicial a granel), usando ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de exclusión con azul tripán en una muestra de TIL a granel, que marca selectivamente las células muertas y permite una evaluación de viabilidad. Otros ensayos para usar en las pruebas de viabilidad pueden incluir, entre otros, el ensayo de azul de Alamar; y el ensayo MTT.

1. Recuento celular, viabilidad, citometría de flujo

En algunas formas de realización, se miden los recuentos y/o la viabilidad de células. La expresión de marcadores tales como, pero no limitados a, CD3, CD4, CD8 y CD56, así como cualquier otro divulgado o descrito en el presente documento, se puede medir mediante citometría de flujo con anticuerpos, por ejemplo, pero sin limitarse a los disponibles comercialmente en BD Bio-sciences (BD Biosciences, San José, CA) utilizando un citómetro de flujo FACSCanto™ (BD Biosciences). Las células se pueden contar manualmente usando un hemocitómetro de chip c desechable (VWR, Batavia, IL) y la viabilidad se puede evaluar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluye, entre otros, la tinción con azul tripán.

En algunos casos, la población de TIL a granel se puede criopreservar inmediatamente, usando los protocolos que se explican más adelante. Alternativamente, la población de TIL a granel puede someterse a REP y luego criopreservarse como se explica más adelante. De manera similar, en el caso de que en terapia se utilicen TIL modificados genéticamente, las poblaciones de TIL a granel o REP pueden someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados.

2. Cultivos celulares

En una forma de realización, un procedimiento para expandir TIL puede incluir el uso de alrededor de 5,000 ml a alrededor de 25,000 ml de medio celular, de alrededor de 5,000 ml a alrededor de 10,000 ml de medio celular o de alrededor de 5,800 ml a alrededor de 8,700 ml de medio celular. En una forma de realización, expandir el

número de TIL no usa más de un tipo de medio de cultivo celular. Puede usarse cualquier medio de cultivo celular adecuado, por ejemplo, medio celular AIM-V (L-glutamina, sulfato de estreptomicina de 50 μ M y sulfato de gentamicina de 10 μ M) medio de cultivo celular (Invitrogen, Carlsbad CA). A este respecto, los procedimientos de la invención reducen ventajosamente la cantidad de medio y el número de tipos de medio requeridos para expandir el número de TIL. En una forma de realización, expandir el número de TIL puede comprender alimentar a las células con una frecuencia no mayor a cada tercer o cuarto día. La expansión del número de células en un recipiente permeable al gas simplifica los procedimientos necesarios para expandir el número de células al reducir la frecuencia de alimentación necesaria para expandir las células.

En una forma de realización, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases no está filtrado. El uso de medio celular sin filtrar puede simplificar los procedimientos necesarios para expandir el número de células. En una forma de realización, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases carece de beta-mercaptoetanol (BME).

La duración del procedimiento comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable al gas que contiene medio celular; obtener TIL de la muestra de tejido tumoral; expandir el número de TIL en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular usando aAPC por una duración de alrededor de 14 a alrededor de 42 días, por ejemplo, alrededor de 28 días.

En una forma de realización, los TIL se expanden en recipientes permeables a los gases. Se han utilizado recipientes permeables a los gases para expandir TIL utilizando PBMC, utilizando procedimientos, composiciones y dispositivos conocidos en la técnica, incluidos los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2005/0106717 A1. En una forma de realización, los TIL se expanden en bolsas permeables a los gases. En una forma de realización, los TIL se expanden utilizando un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables al gas, como el Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). En una forma de realización, los TIL se expanden usando un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables al gas, como el WAVE Bioreactor System, también conocido como Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). En una forma de realización, el sistema de expansión celular incluye una bolsa celular permeable a los gases con un volumen seleccionado del grupo que consta de alrededor de 100 ml, alrededor de 200 ml, alrededor de 300 ml, alrededor de 400 ml, alrededor de 500 ml, alrededor de 600 ml, alrededor de 700 ml, alrededor de 800 ml, alrededor de 900 ml, alrededor de 1 L, alrededor de 2 L, alrededor de 3 L, alrededor de 4 L, alrededor de 5 L, alrededor de 6 L, alrededor de 7 L, alrededor de 8 L, alrededor de 9 L y alrededor de 10 L.

En una forma de realización, los TIL se pueden expandir en matraces G-Rex (disponibles comercialmente en Wilson Wolf Manufacturing). Tales formas de realización permiten que las poblaciones de células se expandan desde alrededor de 5×10^5 células/cm² a entre 10×10^6 y 30×10^6 células/cm². En una forma de realización, esto es sin alimentación. En una forma de realización, esto es sin alimentación siempre que el medio resida a una altura de alrededor de 10 cm en el matraz G-Rex. En una forma de realización, esto es sin alimentación, pero con la adición de una o más citocinas. En una forma de realización, la citocina se puede agregar como un bolo sin necesidad de mezclar la citocina con el medio. Dichos contenedores, dispositivos y procedimientos son conocidos en la técnica y se han utilizado para expandir los TIL, e incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2014/0377739A1, la publicación internacional No. WO 2014/210036 A1, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2013/0115617 A1, la publicación internacional No. WO 2013/188427 A1, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2011/0136228 A1, la patente de EE. UU. No. US 8.809,050 B2, la publicación internacional No. WO 2011/072088 A2, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2016/0208216 A1, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2012/0244133 A1, la publicación internacional No. WO 2012/129201 A1, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. US 2013/0102075 A1, la patente de EE. UU. No. US 8,956,860 B2, la publicación internacional No. WO 2013/173835 A1, la publicación de solicitud de patente estadounidense No. US 2015/0175966 A1. Dichos procedimientos también se describen en Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35: 283-292.

Ingeniería genética opcional de TIL

En algunas formas de realización, opcionalmente los TIL se diseñan genéticamente para incluir funcionalidades adicionales, que incluyen, entre otras, un receptor de células T de alta afinidad (TCR), por ejemplo, un TCR dirigido a un antígeno asociado a tumores como MAGE-1, HER2 o NY-ESO-1, o un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a una molécula de superficie celular asociada a un tumor (por ejemplo, mesotelina) o una molécula de superficie celular de linaje restringido (por ejemplo, CD19).

IV. Procedimientos de tratamiento de pacientes

Los procedimientos de tratamiento comienzan con la recolección inicial de TIL y el cultivo de TIL. Ambos procedimientos han sido descritos en la técnica, por ejemplo, por Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35 (3):

283-292. Se describen ejemplos de procedimientos de tratamiento a lo largo de las secciones siguientes, incluidos los Ejemplos.

Los TIL expandidos producidos de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento, incluidos, por ejemplo, los descritos en las etapas A a F anteriores o de acuerdo con las etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 27) encuentran un uso particular en el tratamiento de pacientes con cáncer (por ejemplo, como se describe en Goff, et al., J. Clinical Oncology, 2016, 34 (20): 2389-239, así como el contenido suplementario. En algunas formas de realización, se cultivaron TIL a partir de depósitos extirpados del melanoma metastásico como se describió anteriormente (véase, Dudley, et al., J Immunother., 2003, 26: 332-342). El tumor fresco se puede diseccionar en condiciones estériles. Se puede recolectar una muestra representativa para un análisis patológico formal. Fragmentos individuales de 2 mm³ a 3 mm³. Pueden obtenerse 5, 10, 15, 20, 25 o 30 muestras por paciente. Pueden obtenerse 20, 25 o 30 muestras por paciente. Se pueden obtener 20, 22, 24, 26 o 28 muestras por paciente. Se pueden obtener 24 muestras por paciente. Las muestras se pueden colocar en pocillos de una placa de 24 pocillos, mantenerse en medio de crecimiento con IL-2 en dosis altas (6,000 UI/ml) y controlarse para detectar la destrucción del tumor y/o la proliferación de TIL. Cualquier tumor con células viables que queden después del tratamiento se puede digerir enzimáticamente en una suspensión de células individuales y criopreservarse, como se describe en el presente documento.

En algunas formas de realización, se puede tomar una muestra de TIL cultivada con éxito para el análisis de fenotipo (CD3, CD4, CD8 y CD56) y ensayar contra un tumor autólogo cuando esté disponible. El TIL puede considerarse reactivo si el cocultivo durante la noche produjo niveles de interferón-gamma (IFN-γ) > 200 pg/ml y el doble de fondo. (Goff et al., J Immunother., 2010, 33: 840-847). En algunas formas de realización, se pueden seleccionar cultivos con evidencia de reactividad autóloga o patrones de crecimiento suficientes para una segunda expansión (por ejemplo, una segunda expansión como se proporciona de acuerdo con la etapa D de la Figura 27), incluidas las segundas expansiones que a veces se denominan expansión rápida (REP). En algunas formas de realización, los TIL expandidos con alta reactividad autóloga (por ejemplo, alta proliferación durante una segunda expansión), se seleccionan para una segunda expansión adicional. En algunas formas de realización, los TIL con alta reactividad autóloga (por ejemplo, alta proliferación durante la segunda expansión como se proporciona en la etapa D de la Figura 27), se seleccionan para una segunda expansión adicional según la etapa D de la Figura 27.

En algunas formas de realización, el paciente no se traslada directamente a ACT (transferencia celular adoptiva); por ejemplo, en algunas formas de realización, después de la recolección del tumor y/o una primera expansión, las células no se utilizan inmediatamente. En tales formas de realización, los TIL se pueden criopreservar y descongelar 2 días antes de la administración a un paciente. En tales formas de realización, los TIL se pueden criopreservar y descongelar 1 día antes de la administración a un paciente. En algunas formas de realización, los TIL se pueden criopreservar y descongelar inmediatamente antes de la administración a un paciente.

Los fenotipos celulares de muestras criopreservadas de bolsa de infusión TIL se pueden analizar mediante citometría de flujo (por ejemplo, FlowJo) para los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8, CCR7 y CD45RA (BD BioSciences), así como mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. Las citocinas séricas se midieron usando técnicas estándar de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Un aumento de IFN-γ sérico se definió como > 100 pg/ml y superior a 4 3 niveles basales.

En algunas formas de realización, los TIL producidos por los procedimientos proporcionados en este documento, por ejemplo, los ejemplificados en la Figura 27, proporcionan una mejora sorprendente en la eficacia clínica de los TIL. En algunas formas de realización, los TIL producidos por los procedimientos proporcionados en este documento, por ejemplo, los ejemplificados en la Figura 27, exhiben una mayor eficacia clínica en comparación con los TIL producidos por procedimientos distintos de los descritos en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los ejemplificados en la Figura 27. En algunas formas de realización, los procedimientos distintos de los descritos en este documento incluyen procedimientos denominados procedimiento 1C y/o Generación 1 (Gen 1). En algunas formas de realización, la eficacia aumentada se mide mediante DCR, ORR y/u otras respuestas clínicas. En algunas formas de realización, los TIL producidos por los procedimientos proporcionados en este documento, por ejemplo, los ejemplificados en la Figura 27, exhiben un tiempo de respuesta similar y un perfil de seguridad en comparación con los TIL producidos por procedimientos distintos de los descritos en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los ejemplificados en la Figura 27, por ejemplo, el procedimiento Gen 1.

En algunas formas de realización, IFN-gamma (IFN-γ) es indicativo de la eficacia del tratamiento y/o eficacia clínica aumentada. En algunas formas de realización, el IFN-γ en la sangre de sujetos tratados con TIL es indicativo de TIL activos. En algunas formas de realización, se emplea un ensayo de potencia para la producción de IFN-γ. La producción de IFN-γ es otra medida del potencial citotóxico. La producción de IFN-γ se puede medir determinando los niveles de la citocina IFN-γ en la sangre, suero o TIL ex vivo de un sujeto tratado con TIL preparado por los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, un aumento de IFN-γ es indicativo de la eficacia del tratamiento en un paciente tratado con los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención. En

algunas formas de realización, el IFN- γ aumenta una, dos, tres, cuatro o cinco veces o más en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los que se proporcionan en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta tres veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta cuatro veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta cinco veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados utilizando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide usando un kit de ELISA Quantikine. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide en TIL ex vivo de un sujeto tratado con TIL preparado mediante los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide en la sangre de un sujeto tratado con TIL preparados mediante los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide en el suero de TIL de un sujeto tratado con TIL preparado mediante los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27.

En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 es indicativo de la eficacia del tratamiento y/o la eficacia clínica aumentada. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 en la sangre de los sujetos tratados con TIL es indicativo de TIL activos. La producción de IP-10 puede medirse determinando los niveles de IP-10 en la sangre de un sujeto tratado con TIL preparados por los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 es indicativo de la eficacia del tratamiento en un paciente tratado con los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de una, dos, tres, cuatro o cinco veces o más en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los encarnados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los encarnados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de tres veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los encarnados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de cuatro veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los encarnados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de cinco veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los encarnados en la Figura 27. En algunas formas de realización, IP-10 se mide en la sangre de un sujeto tratado con TIL preparados mediante los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, IP-10 se mide en suero de TIL de un sujeto tratado con TIL preparado mediante los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27.

En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 es indicativo de la eficacia del tratamiento y/o eficacia clínica incrementada. En algunas formas de realización, el promedio más alto de MCP-1 en la sangre de sujetos tratados con TIL es indicativo de TIL activos. La producción de MCP-1 se puede medir determinando los niveles de MCP-1 en la sangre de un sujeto tratado con TIL preparados por los

procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de MCP-1 es indicativo de la eficacia del tratamiento en un paciente tratado con los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención. En algunas formas de realización, el promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de una, dos, tres, cuatro o cinco veces o más en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los encarnados en la Figura 27. En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los encarnados en la Figura 27. En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de tres veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los encarnados en la Figura 27. En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de cuatro veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los encarnados en la Figura 27. En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de cinco veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los encarnados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la MCP-1 se mide en la sangre de un sujeto tratado con TIL preparados mediante los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, la MCP-1 se mide en el suero de TIL de un sujeto tratado con TIL preparado mediante los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27.

En algunas formas de realización, los TIL preparados por los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27, exhiben una mayor policlonalidad en comparación con los TIL producidos por otros procedimientos, incluidos los no ejemplificados en la Figura 27, tales como, por ejemplo, procedimientos denominados procedimientos de proceso 1C. En algunas formas de realización, una policlonalidad significativamente mejorada y/o una policlonalidad aumentada es indicativa de la eficacia del tratamiento y/o la eficacia clínica aumentada. En algunas formas de realización, la policlonalidad se refiere a la diversidad del repertorio de células T. En algunas formas de realización, un aumento en la policlonalidad puede ser indicativo de la eficacia del tratamiento con respecto a la administración de los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta una vez, dos veces, diez veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces en comparación con los TIL preparados utilizando procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta diez veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta 100 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta 500 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad se incrementa 1000 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27.

Las medidas de eficacia pueden incluir las mediciones de la tasa de control de la enfermedad (DCR) así como la tasa de respuesta global (ORR), como se conoce en la técnica, así como se describe en los Ejemplos proporcionados en este documento, incluido el Ejemplo 28.

1. Procedimientos de tratamiento de cánceres y otras enfermedades

Las composiciones descritas en este documento se pueden utilizar en un procedimiento para tratar enfermedades. En una forma de realización, son para el uso en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos. También se pueden usar para tratar otros trastornos como se describen en el presente documento y en los siguientes párrafos.

En algunas formas de realización, el trastorno hiperproliferativo es cáncer. En algunas formas de realización, el trastorno hiperproliferativo es un cáncer de tumor sólido. En algunas formas de realización, el cáncer de tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), cáncer renal y carcinoma de células renales. En algunas formas de realización, el trastorno hiperproliferativo es una neoplasia maligna hematológica. El cáncer de tumor sólido puede seleccionarse del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma difuso de células B grandes, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma folicular y linfoma de células del manto.

También se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un procedimiento para tratar un cáncer con una población de TIL, en donde un paciente se trata previamente con quimioterapia no mieloablativa antes de una infusión de TIL de acuerdo con la presente divulgación. La quimioterapia no mieloablativa puede ser ciclofosfamida de 60 mg/kg/d durante 2 días (días 27 y 26 antes de la infusión de TIL) y fludarabina de 25 mg/m²/d durante 5 días (días 27 a 23 antes de la infusión de TIL). Después de la quimioterapia no mieloablativa y la infusión de TIL (en el día 0) según la presente divulgación, el paciente puede recibir una infusión intravenosa de IL-2 por vía intravenosa a 720,000 UI/kg cada 8 horas hasta tolerancia fisiológica.

La eficacia de los compuestos y combinaciones de compuestos descritos en el presente documento para tratar, prevenir y/o manejar las enfermedades o trastornos indicados se puede probar usando diversos modelos conocidos en la técnica, que proporcionan una guía para el tratamiento de enfermedades humanas. Por ejemplo, se describen modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de ovario, por ejemplo, en Mullany, et al., *Endocrinology* 2012, 153, 1585-92; y Fong, et al., *J. Ovarian Res.* 2009, 2, 12. Models for determining efficacy of treatments for pancreatic cancer are described in Herreros-Villanueva, et al., *World J. Gastroenterol.* 2012, 18, 1286-1294. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de mama se describen, por ejemplo, en Fantozzi, *Breast Cancer Res.* 2006, 8, 212. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el melanoma se describen, por ejemplo, en Damsky, et al., *Pigment Cell & Melanoma Res.* 2010, 23, 853-859. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de pulmón se describen, por ejemplo, en Meuwissen, et al., *Genes & Development*, 2005, 19, 643-664. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de pulmón se describen, por ejemplo, en Kim, *Clin. Exp. Otorrinolaringol.* 2009, 2, 55-60; y Sano, *Head Neck Oncol.* 2009, 1, 32.

En algunas formas de realización, IFN-gamma (IFN- γ) es indicativo de la eficacia del tratamiento para el tratamiento del trastorno hiperproliferativo. En algunas formas de realización, el IFN- γ en la sangre de sujetos tratados con TIL es indicativo de TIL activos. En algunas formas de realización, se emplea un ensayo de potencia para la producción de IFN- γ . La producción de IFN- γ es otra medida del potencial citotóxico. La producción de IFN- γ puede medirse determinando los niveles de la citocina IFN- γ en la sangre de un sujeto tratado con TIL preparados mediante los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos mediante el presente procedimiento proporcionan un aumento de IFN- γ en la sangre de sujetos tratados con los TIL del presente procedimiento en comparación con sujetos tratados con TIL preparados utilizando procedimientos denominados proceso 1C, como se ejemplifica en la Figura 83. En algunas formas de realización, un aumento de IFN- γ es indicativo de la eficacia del tratamiento en un paciente tratado con los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención. En algunas formas de realización, el IFN- γ aumenta una, dos, tres, cuatro o cinco veces o más en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los que se proporcionan en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta tres veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta cuatro veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este

documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la secreción de IFN- γ aumenta cinco veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados utilizando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide usando un kit de ELISA Quantikine. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide usando un kit de ELISA Quantikine. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide en TIL ex vivo de un paciente tratado con los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide en sangre en un paciente tratado con los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención. En algunas formas de realización, el IFN- γ se mide en suero en un paciente tratado con los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención.

En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 es indicativo de la eficacia del tratamiento y/o la eficacia clínica aumentada para el tratamiento del trastorno hiperproliferativo. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 en la sangre de los sujetos tratados con TIL es indicativo de TIL activos. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos por el presente procedimiento proporcionan un promedio más alto de IP-10 en la sangre de los sujetos tratados con los TIL del presente procedimiento en comparación con los sujetos tratados con los TIL preparados usando procedimientos denominados proceso 1C, como se ejemplifica en la Figura. 83. La producción de IP-10 puede medirse determinando los niveles de IP-10 en la sangre de un sujeto tratado con TIL preparados por los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 es indicativo de la eficacia del tratamiento en un paciente tratado con los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de una, dos, tres, cuatro o cinco veces o más en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en el presente documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de tres veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de cuatro veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de IP-10 se correlaciona con un aumento de cinco veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27.

En algunas formas de realización, el promedio más alto de MCP-1 es indicativo de la eficacia del tratamiento y/o la eficacia clínica aumentada para el tratamiento del trastorno hiperproliferativo. En algunas formas de realización, el promedio más alto de MCP-1 en la sangre de sujetos tratados con TIL es indicativo de TIL activos. En algunas formas de realización, los TIL obtenidos por el presente procedimiento proporcionan un promedio más alto de MCP-1 en la sangre de sujetos tratados con los TIL del presente procedimiento en comparación con sujetos tratados con TIL preparados usando procedimientos denominados proceso 1C, como se ejemplifica en la Figura 83. La producción de MCP-1 se puede medir determinando los niveles de MCP-1 en la sangre de un sujeto tratado con TIL preparados por los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27. En algunas formas de realización, el promedio más alto de MCP-1 es indicativo de la eficacia del tratamiento en un paciente tratado con los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención. En algunas formas de realización, el promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de una, dos, tres, cuatro o cinco veces o más en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos

distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de tres veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de cuatro veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, un promedio más alto de MCP-1 se correlaciona con un aumento de cinco veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27.

En algunas formas de realización, los TIL preparados mediante los procedimientos de la presente invención, incluidos los descritos, por ejemplo, en la Figura 27, exhiben una mayor policlonalidad en comparación con los TIL producidos por otros procedimientos, incluidos los no ejemplificados en la Figura 27, tales como, por ejemplo, procedimientos denominados procedimientos de proceso 1C. En algunas formas de realización, una policlonalidad significativamente mejorada y/o una policlonalidad aumentada es indicativa de la eficacia del tratamiento y/o la eficacia clínica aumentada para el tratamiento del cáncer. En algunas formas de realización, la policlonalidad se refiere a la diversidad del repertorio de células T. En algunas formas de realización, un aumento en la policlonalidad puede ser indicativo de la eficacia del tratamiento con respecto a la administración de los TIL producidos por los procedimientos de la presente invención. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta una vez, dos veces, diez veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces en comparación con los TIL preparados utilizando procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta diez veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta 100 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad aumenta 500 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27. En algunas formas de realización, la policlonalidad se incrementa 1000 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados usando otros procedimientos distintos de los proporcionados en este documento, incluidos, por ejemplo, procedimientos distintos de los incorporados en la Figura 27.

2. Procedimientos de coadministración

En algunas formas de realización, los TIL producidos como se describe en este documento, incluidos, por ejemplo, los TIL derivados de un procedimiento descrito en las etapas A a F de la Figura 27, pueden ser para administración en combinación con uno o más reguladores de puntos de control inmunitarios, tales como los anticuerpos descritos más adelante. Por ejemplo, los anticuerpos que se dirigen a PD-1 y que pueden coadministrarse con los TIL de la presente invención incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a nivolumab (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), pembrolizumab (lambrolizumab, MK03475 o MK-3475, Merck; Keytruda®), anticuerpo anti-PD-1 humanizado JS001 (ShangHai JunShi), anticuerpo monoclonal anti-PD-1 TSR-042 (Tesar, Inc.), pidilizumab (anti-PD-1 mAb CT-011, Medivation), anticuerpo monoclonal anti-PD-1 BGB-A317 (BeiGene) y/o anticuerpo anti-PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), anticuerpo monoclonal humano REGN2810 (Regeneron), anticuerpo monoclonal humano MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb) y/o anticuerpo IgG4 anti-PD-1 humanizado PDR001 (Novartis). En algunas formas de realización, el anticuerpo PD-1 es del clon: RMP1-14 (IgG de rata) - BioXcell cat#BP0146. Otros anticuerpos adecuados, que son adecuados para usar en procedimientos de coadministración con TIL producidos de acuerdo con las Etapas A a F como se describen en el presente documento, son los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la Patente de Estados Unidos No. 8,008,449. En algunas formas de realización, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a PD-L1 e inhibe su interacción con PD-1, aumentando así la actividad inmunitaria. Cualquier anticuerpo conocido en la técnica que se una a PD-L1 y afecte la interacción entre PD-

1 y PD-L1, y estimule una respuesta inmune antitumoral, es adecuado para usar en procedimientos de coadministración con TIL producidos de acuerdo con las etapas A a F, tal como se describe en este documento. Por ejemplo, los anticuerpos que se dirigen a PD-L1 y que se encuentran en ensayos clínicos incluyen BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) y MPDL3280A (Genentech). Otros anticuerpos adecuados que se dirigen a PD-L1 se divulgan en la patente de EE.UU. No. 7,943,743. Un experto en la materia entenderá que cualquier anticuerpo que se una a PD-1 o PD-L1, afecte la interacción PD-1/PD-L1 y estimule una respuesta inmunitaria antitumoral, es adecuado para su uso en procedimientos de co-administración con TIL producidos de acuerdo con las etapas A a F como se describe en el presente documento. El sujeto al que se le administra la combinación de TIL producida de acuerdo con las etapas A a F puede coadministrarse con un anticuerpo anti-PD-1 cuando el paciente tiene un tipo de cáncer que es refractario a la administración del anticuerpo anti-PD-1 solo. Al paciente se le pueden administrar TIL en combinación con y anti-PD-1 cuando el paciente tiene melanoma refractario. Al paciente se le pueden administrar TIL en combinación con y anti-PD-1 cuando el paciente tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

3. Acondicionamiento previo opcional de los pacientes por linfodepleción

También se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un procedimiento para tratar un cáncer con una población de TIL, en donde un paciente se trata previamente con quimioterapia no mieloablativa antes de una infusión de TIL de acuerdo con la presente divulgación. También se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, una población de TIL para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente que ha sido tratado previamente con quimioterapia no mieloablativa. La población de TIL puede ser para administración por infusión. La quimioterapia no mieloablativa puede ser ciclofosfamida de 60 mg/kg/d durante 2 días (días 27 y 28 antes de la infusión de TIL) y fludarabina de 25 mg/m²/d durante 5 días (días 27 a 31 antes de la infusión de TIL). Después de la quimioterapia no mieloablativa y la infusión de TIL (en el día 0) de acuerdo con la presente divulgación, el paciente puede recibir una infusión intravenosa de IL-2 (aldesleucina, disponible comercialmente como PROLEUKIN) por vía intravenosa a 720,000 UI/kg cada 8 horas hasta tolerancia fisiológica. La población de TIL puede usarse en el tratamiento del cáncer en combinación con IL-2, en donde la IL-2 se administra después de la población de TIL.

Los hallazgos experimentales indican que la linfodepleción antes de la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de tumor desempeña un papel clave en la mejora de la eficacia del tratamiento al eliminar las células T reguladoras y los elementos competidores del sistema inmunológico ("sumideros de citocinas"). Por consiguiente, se puede utilizar una etapa de linfodepleción (a veces también denominada "acondicionamiento inmunosupresor") en el paciente antes de la introducción de los TIL de la invención.

En general, la linfodepleción se logra usando la administración de fludarabina o ciclofosfamida (la forma activa se denomina mafosfamida) y combinaciones de las mismas. Dichos procedimientos se describen en Gassner, et al., Cancer Immunol. Immunother. 2011, 60, 75-85; Muranski, et al., Nat. Clin. Pract. Oncol., 2006, 3, 668-681; Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-5239, y Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-2357.

En algunas formas de realización, la fludarabina se administra a una concentración de 0.5 µg/ml -10 µg/ml de fludarabina. En algunas formas de realización, la fludarabina se administra a una concentración de 1 µg/ml de fludarabina. El tratamiento con fludarabina se puede administrar durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días o más. En algunas formas de realización, la fludarabina se administra en dosis de 10 mg/kg/día, 15 mg/kg/día, 20 mg/kg/día, 25 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 35 mg/kg/día, 40 mg/kg/día o 45 mg/kg/día. En algunas formas de realización, el tratamiento con fludarabina se administra durante 2-7 días a 35 mg/kg/día. En algunas formas de realización, el tratamiento con fludarabina se administra durante 4-5 días a 35 mg/kg/día. En algunas formas de realización, el tratamiento con fludarabina se administra durante 4-5 días a 25 mg/kg/día.

En algunas formas de realización, la mafosfamida, la forma activa de ciclofosfamida, se obtiene a una concentración de 0.5 µg/ml -10 µg/ml mediante la administración de ciclofosfamida. En algunas formas de realización, la mafosfamida, la forma activa de ciclofosfamida, se obtiene a una concentración de 1 µg/ml mediante la administración de ciclofosfamida. En algunas formas de realización, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días o más. En algunas formas de realización, la ciclofosfamida se administra a una dosis de 100 mg/m²/día, 150 mg/m²/día, 175 mg/m²/día, 200 mg/m²/día, 225 mg/m²/día, 250 mg/m²/día, 275 mg/m²/día o 300 mg/m²/día. En algunas formas de realización, la ciclofosfamida se administra por vía intravenosa (es decir, i.v.) En algunas formas de realización, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 2-7 días a 35 mg/kg/día. En algunas formas de realización, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 4-5 días a 250 mg/m²/día i.v. En algunas formas de realización, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 4 días a 250 mg/m²/día i.v.

En algunas formas de realización, la linfodepleción se realiza administrando la fludarabina y la ciclofosfamida juntas a un paciente. En algunas formas de realización, la fludarabina se administra a 25 mg/m²/día i.v. y la ciclofosfamida se administra a 250 mg/m²/día i.v. por 4 días.

En algunas formas de realización, la linfodepleción se realiza mediante la administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m²/día durante dos días, seguida de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m²/día durante cinco días.

4. Regímenes de IL-2

- 5 En una forma de realización, el régimen de IL-2 comprende un régimen de IL-2 de dosis alta, en donde el régimen de IL-2 de dosis alta comprende aldesleucina, o un biosimilar o una variante de la misma, administrada por vía intravenosa comenzando el día después de administrar una porción terapéuticamente eficaz de la población terapéutica de TIL, en donde la aldesleucina o un biosimilar o una variante de la misma se administra a una dosis de 0.037 mg/kg o 0.044 mg/kg UI/kg (masa corporal del paciente) mediante infusiones intravenosas en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia, para un máximo de 14 dosis. Después de 9 días de reposo, este programa puede repetirse para otras 14 dosis, hasta un máximo de 28 dosis en total.

- 15 En una forma de realización, el régimen de IL-2 comprende un régimen de IL-2 decreciente. Se han descrito regímenes de IL-2 decreciente en O'Day, et al., J. Clin. Oncol. 1999, 17, 2752-61 y Eton, et al., Cancer 2000, 88, 1703-9. En una forma de realización, un régimen decreciente de IL-2 comprende 18 x 10⁶ UI/m² administrados por vía intravenosa durante 6 horas, seguidos de 18 x 10⁶ UI/m² administrados por vía intravenosa durante 12 horas, seguidos de 18 x 10⁶ UI/m² administrados por vía intravenosa durante 12 horas, seguidos de 18 x 10⁶ UI/m² administradas por vía intravenosa durante 24 horas, seguidas de 4.5 x 10⁶ UI/m² administradas por vía intravenosa durante 72 horas. Este ciclo de tratamiento puede repetirse cada 28 días durante un máximo de cuatro ciclos. En una forma de realización, un régimen decreciente de IL-2 comprende 18,000,000 UI/m² el día 1, 9,000,000 UI/m² el día 2 y 4,500.000 UI/m² los días 3 y 4.

En una forma de realización, el régimen de IL-2 comprende la administración de IL-2 pegilada cada 1, 2, 4, 6, 7, 14 o 21 días a una dosis de 0.10 mg/día a 50 mg/día.

5. Transferencia de células adoptivas

- 25 La transferencia de células adoptivas (ACT) es una forma muy eficaz de inmunoterapia e implica la transferencia de células inmunes con actividad antitumoral a pacientes con cáncer. ACT es un enfoque de tratamiento que implica la identificación, in vitro, de linfocitos con actividad antitumoral, la expansión in vitro de estas células a grandes cantidades y su infusión en el huésped portador del cáncer. Los linfocitos utilizados para la transferencia adoptiva se pueden derivar del estroma de tumores extirpados (linfocitos infiltrantes de tumores o TIL). Los TIL para ACT se pueden preparar como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, los TIL se preparan, por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento como se describe en la Figura 27. También se pueden derivar o de la sangre si están diseñados genéticamente para expresar receptores de células T antitumorales (TCR), o de receptores de antígenos quiméricos (CAR), enriquecidos con cultivos mixtos de células tumorales de linfocitos (MLTC) o clonados utilizando células presentadoras de antígenos autólogas y péptidos derivados de tumores. La ACT en la que los linfocitos se originan en el huésped portador del cáncer que se va a infundir se denomina ACT autóloga. La publicación de Estados Unidos No. 2011/0052530 se refiere a un procedimiento para realizar terapia celular adoptiva para promover la regresión del cáncer, principalmente para el tratamiento de pacientes que padecen melanoma metastásico. En algunas formas de realización, los TIL pueden administrarse como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, los TIL se pueden administrar en una sola dosis. Tal administración puede ser mediante inyección, por ejemplo, inyección intravenosa. En algunas formas de realización, se pueden administrar TIL y/o linfocitos citotóxicos en múltiples dosis. La dosificación puede ser una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de seis veces al año. La dosificación puede ser una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana o una vez cada dos días. La administración de TIL y/o linfocitos citotóxicos puede continuar tanto tiempo como sea necesario.

6. Ejemplos de tratamiento ejemplar

- La presente divulgación incluye un procedimiento para tratar un cáncer con una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que comprende las etapas de (a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un paciente; (b) realizar una expansión inicial de la primera población de TIL en un primer medio de cultivo celular para obtener una segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 5 veces mayor en número que la primera población de TIL, y en donde el primer medio de cultivo celular comprende IL-2; (c) realizar una expansión rápida de la segunda población de TIL utilizando una población de células presentadoras de antígenos 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 de al menos 50 veces mayor en número que la segunda población de TIL después de 7 días desde el inicio de la rápida expansión; y en donde el segundo medio de cultivo celular comprende IL-2 y OKT-3; (d) administrar una porción terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL a un paciente con cáncer. La presente divulgación también incluye una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la población de TIL se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las etapas 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 al 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 utilizando una población de células presentadoras de antígenos 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 de al menos 50 -se multiplicó en número que la segunda población de TIL después de 7 días desde el inicio de la rápida expansión; y en donde el segundo medio de cultivo celular comprende IL-2 y OKT-3; (d) administrar una porción terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL a un paciente con cáncer. La presente divulgación también incluye una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la población de TIL se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las etapas de (b) realizar una expansión inicial de una primera población de TIL obtenidos a partir 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 al 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 utilizando una población de células presentadoras de antígenos 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 de al menos 50 veces mayor en número que la segunda población de TIL después de 7 días desde el inicio de la rápida expansión; y en donde el segundo medio de cultivo celular comprende IL-2 y OKT-3; (d) administrar una porción terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL a un paciente con cáncer. El procedimiento puede comprender una primera etapa (a) de obtener la primera población de TIL de un tumor extirpado de un paciente. La IL-2 puede estar presente a una concentración inicial de alrededor de 3000 UI/ml y el anticuerpo OKT-3 está presente a una concentración inicial de alrededor de 30 ng/mL en el segundo medio de cultivo celular. La primera expansión se puede realizar durante un período no mayor de 14 días. La primera expansión se puede realizar utilizando un recipiente permeable a los gases. La segunda expansión se puede realizar utilizando un recipiente permeable a los gases. La relación de la segunda población de TIL a la población de aAPC en la rápida expansión puede estar entre 1 a 80 y 1 a 400. La relación de la segunda población de TIL a la población de aAPC en la rápida expansión puede ser de alrededor de 1 a 300. El cáncer para el tratamiento puede seleccionarse del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), cáncer renal y carcinoma de células renales. El cáncer para el tratamiento puede seleccionarse del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario y cáncer de cuello uterino. El cáncer para el tratamiento puede ser el melanoma. El cáncer para el tratamiento puede ser cáncer de ovario. El cáncer para el tratamiento puede ser cáncer de cuello uterino. El procedimiento de tratamiento del cáncer puede comprender además la etapa de tratar al paciente con un régimen de linfodepleción no mieloablativa antes de administrar la tercera población de TIL al paciente. El régimen de linfodepleción no mieloablativa puede comprender las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m²/día durante dos días, seguida de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m²/día durante cinco días. El régimen de dosis alta de IL-2 puede comprender 600,000 o 720,000 UI/kg de aldesleucina, o un biosimilar o una variante de la misma, administrado como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

V. Ejemplos ilustrativos

La presente divulgación incluye, pero no reivindica, un procedimiento para tratar a un sujeto con cáncer, y el procedimiento comprende la administración de linfocitos infiltrantes de tumores expandidos (TIL), que comprende:

(a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor;

(b) agregar los fragmentos de tumor a un sistema cerrado;

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

(d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión es realizada durante alrededor de 11 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área de superficie permeable a los gases, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) ocurre sin abrir el sistema;

- (e) recolectar la población terapéutica de TIL obtenida de la etapa (d), en donde la transición de la etapa (d) a la etapa (e) ocurre sin abrir el sistema; y
- (f) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (e) a una bolsa de infusión, en donde la transferencia de la etapa (e) a la (f) ocurre sin abrir el sistema;
- 5 (g) crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada de la etapa (f) usando un procedimiento de crioconservación; y
- (h) administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL de la bolsa de infusión en la etapa (g) al paciente.
- 10 El procedimiento de crioconservación puede comprender la crioconservación en un medio que comprende DMSO. Los medios de crioconservación pueden comprender de un 7% a un 10% de DMSO. El medio de crioconservación puede ser CS10.
- La población terapéutica de TIL recolectados en la etapa (e) puede comprender suficientes TIL para administrar una dosis terapéuticamente eficaz de los TIL en la etapa (h).
- 15 El número de TIL suficientes para administrar una dosis terapéuticamente eficaz en la etapa (h) puede ser de alrededor de 2.3×10^{10} a alrededor de 13.7×10^{10} .
- Las células presentadoras de antígeno (APC) pueden ser PBMC.
- Las PBMC se pueden agregar al cultivo celular en cualquiera de los días 9 a 11 en la etapa (d).
- Antes de administrar una dosis terapéuticamente eficaz de células TIL en la etapa (h), se puede haber administrado al paciente un régimen de linfodepleción no mieloablativa.
- 20 El régimen de linfodepleción no mieloablativa puede comprender las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m²/día durante dos días seguido de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m²/día durante cinco días.
- El procedimiento puede comprender además la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 de dosis alta comenzando el día después de la administración de las células TIL al paciente en la etapa (h).
- 25 El régimen de IL-2 de dosis alta puede comprender 600,000 o 720,000 UI/kg administrados como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.
- La tercera población de TIL en la etapa (d) puede proporcionar mayor eficacia, producción aumentada de interferón-gamma (IFN-γ), policlonalidad aumentada, promedio aumentado de IP-10 y/o promedio aumentado de MCP-1 cuando se administra a un sujeto. El aumento de IFN-γ, IP-10 de promedio aumentado y/o MCP-1 de promedio aumentado pueden medirse en la sangre del sujeto tratado con los TIL.
- 30 El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), cáncer de riñón y carcinoma de células renales. El cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en melanoma, HNSCC, cánceres de cuello uterino y NSCLC. En algunas formas de realización, el cáncer es melanoma. El cáncer puede ser HNSCC. El cáncer puede ser un cáncer de cuello uterino. El cáncer puede ser NSCLC.
- 35 En una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL).
- 40 En el presente documento se divulga un procedimiento para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que comprende: (a) obtener una muestra de tumor de un paciente, en donde dicha muestra de tumor comprende una primera población de TIL; (b) convertir dicha muestra de tumor en múltiples fragmentos de tumor; (c) agregar dichos fragmentos de tumor a un recipiente cerrado; (d) realizar una expansión inicial de dicha primera población de TIL en un primer medio de cultivo celular para obtener una segunda población de TIL, en donde
- 45 dicho primer medio de cultivo celular comprende IL-2, en donde dicha expansión inicial se realiza en dicho recipiente cerrado que proporciona al menos 100 cm² de área superficial permeable al gas, en donde dicha expansión inicial se realiza dentro de un primer período de alrededor de 7-14 días para obtener una segunda población de TIL, en donde dicha segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que dicha primera población de TIL, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;
- 50 (e) expandir dicha segunda población de TIL en un segundo medio de cultivo celular, en donde dicho segundo medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC, también conocidas como células mononucleares (MNC)), donde dicha expansión se realiza dentro de un segundo período de alrededor de 7-14 días para obtener una tercera población de TIL, en donde dicha tercera población

- de TIL exhibe una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde dicha expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona al menos 500 cm² de área de superficie permeable a los gases, y en donde la transición de la etapa (d) a la etapa (e) se produce sin abrir el sistema; (f) recolectar dicha tercera población de TIL obtenida de la etapa (e), en donde la transición de la etapa (e) a la etapa (f) ocurre sin abrir el sistema; y (g) transferir dicha población de TIL recolectada de la etapa (f) a una bolsa de infusión, en donde dicha transferencia de la etapa (f) a (g) ocurre sin abrir el sistema. El procedimiento puede ser in vitro o ex vivo.
- El procedimiento puede comprender además la recolección en la etapa (f) a través de un sistema de tratamiento celular, tal como el sistema LOVO fabricado por Fresenius Kabi. El término "sistema de tratamiento de células LOVO" también se refiere a cualquier instrumento o dispositivo fabricado por cualquier proveedor, que pueda bombear una solución que comprende células a través de una membrana o filtro, como una membrana giratoria o un filtro giratorio, en un entorno de sistema cerrado y/o estéril, lo que permite flujo continuo y tratamiento celular para eliminar el sobrenadante o los medios de cultivo celular sin formación de pellas. En algunos casos, el sistema de tratamiento celular puede realizar la separación celular, lavado, intercambio de fluidos, concentración y/u otras etapas de tratamiento celular en un sistema cerrado y estéril.
- El recipiente cerrado se puede seleccionar del grupo que consta de un recipiente G y una bolsa de células Xuri.
- La bolsa de infusión en la etapa (g) puede ser una bolsa de infusión que contenga HypoThermosol.
- El primer período en la etapa (d) y dicho segundo período en la etapa (e) pueden realizarse cada uno individualmente dentro de un período de 10 días, 11 días o 12 días.
- El primer período en la etapa (d) y dicho segundo período en la etapa (e) pueden realizarse individualmente cada uno dentro de un período de 11 días.
- Las etapas (a) a (g) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 25 días a alrededor de 30 días.
- Las etapas (a) a (g) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 20 días a alrededor de 25 días.
- Las etapas (a) a (g) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 20 días a alrededor de 22 días.
- Las etapas (a) a (g) se pueden realizar en 22 días o menos.
- Las etapas (c) a (f) se pueden realizar en un solo recipiente, en donde realizar las etapas (c) a (f) en un solo recipiente da como resultado un aumento en el rendimiento de TIL por tumor extirpado en comparación con la realización de las etapas (c) a (f) en más de un recipiente.
- Las PBMC se pueden agregar a los TIL durante el segundo período en la etapa (e) sin abrir el sistema.
- Las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de dicha tercera población de TIL pueden exhibir una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la expresión de CD27+, la expresión de CD28+, telómeros más largos, expresión aumentada de CD57 y expresión disminuida de CD56, en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de dicha segunda población de células.
- Las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de dicha tercera población de TIL pueden exhibir una expresión de CD57 aumentada y una expresión de CD56 disminuida con respecto a las células T efectoras y/o células T de memoria central obtenidas de dicha segunda población de células.
- El riesgo de contaminación microbiana se puede reducir en comparación con un sistema abierto.
- Los TIL de la etapa (g) se pueden infundir a un paciente.
- También se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente con una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de tumor de un paciente, en donde dicha muestra de tumor comprende una primera población de TIL; (b) convertir dicha muestra de tumor en múltiples fragmentos de tumor; (c) agregar dichos fragmentos de tumor a un recipiente cerrado; (d) realizar una expansión inicial de dicha primera población de TIL en un primer medio de cultivo celular para obtener una segunda población de TIL, en donde dicho primer medio de cultivo celular comprende IL-2, en donde dicha expansión inicial se realiza en dicho recipiente cerrado que proporciona al menos 100 cm² de área superficial permeable al gas, en donde dicha expansión inicial se realiza dentro de un primer período de alrededor de 7-14 días para obtener una segunda población de TIL, en donde dicha segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que dicha primera población de TIL, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema; (e) expandir dicha segunda población de TIL en un segundo medio de cultivo celular, en donde dicho segundo medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en donde dicha expansión se realiza dentro de un segundo período de alrededor de 7-14 días para obtener una tercera

población de TIL, en donde dicha tercera población de TIL exhibe una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde dicha expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona al menos 500 cm² de área superficial permeable a los gases, y en donde la transición de la etapa (d) a la etapa (e) se produce sin abrir el sistema; (f) recolectar dicha tercera población de TIL obtenida de la etapa (e), en donde la transición de la etapa (e) a la etapa (f) ocurre sin abrir el sistema; (g) transferir dicha población de TIL recolectada de la etapa (f) a una bolsa de infusión, en donde dicha transferencia de la etapa (f) a (g) ocurre sin abrir el sistema; y (h) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células TIL de dicha bolsa de infusión en la etapa (g) a dicho paciente.

También se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la población de TIL se puede obtener a partir de un procedimiento que comprende las etapas de: (b) tratar una muestra de tumor obtenida de un paciente en donde dicha muestra de tumor comprende una primera población de TIL en múltiples fragmentos de tumor; (c) agregar dichos fragmentos de tumor a un recipiente cerrado; (d) realizar una expansión inicial de dicha primera población de TIL en un primer medio de cultivo celular para obtener una segunda población de TIL, en donde dicho primer medio de cultivo celular comprende IL-2, en donde dicha expansión inicial se realiza en dicho recipiente cerrado que proporciona al menos 100 cm² de área superficial permeable al gas, en donde dicha expansión inicial se realiza dentro de un primer período de alrededor de 7-14 días para obtener una segunda población de TIL, en donde dicha segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que dicha primera población de TIL, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema; (e) expandir dicha segunda población de TIL en un segundo medio de cultivo celular, en donde dicho segundo medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en donde dicha expansión se realiza dentro de un segundo período de alrededor de 7-14 días para obtener una tercera población de TIL, en donde dicha tercera población de TIL exhibe una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde dicha expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona al menos 500 cm² de área superficial permeable a los gases, y en donde la transición de la etapa (d) a la etapa (e) se produce sin abrir el sistema; (f) recolectar dicha tercera población de TIL obtenida de la etapa (e), en donde la transición de la etapa (e) a la etapa (f) ocurre sin abrir el sistema; (g) transferir dicha población de TIL recolectada de la etapa (f) a una bolsa de infusión, en donde dicha transferencia de la etapa (f) a (g) ocurre sin abrir el sistema. El procedimiento puede comprender una primera etapa de (a) obtener la muestra de tumor de un paciente, en donde dicha muestra de tumor comprende la primera población de TIL. La población de TIL puede ser para administración desde dicha bolsa de infusión en la etapa (g) en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Antes de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células TIL en la etapa (h), se puede haber administrado a dicho paciente un régimen de linfodepleción no mieloablativa. Las poblaciones de TIL pueden ser para administración a un paciente que se ha sometido a un régimen de linfodepleción no mieloablativa.

El régimen de linfodepleción no mieloablativa puede comprender los pasos de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m²/día durante dos días, seguida de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m²/día durante cinco días.

El procedimiento puede comprender además la etapa de tratar a dicho paciente con un régimen de IL-2 de dosis alta comenzando el día después de la administración de dichas células TIL a dicho paciente en la etapa (h). Las poblaciones de TIL pueden ser para administración antes de un régimen de IL-2 de dosis alta. La población de TIL puede ser para la administración un día antes del inicio del régimen de dosis alta de IL-2.

El régimen de IL-2 de dosis alta puede comprender 600,000 o 720,000 UI/kg administrados como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

Las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de dicha tercera población de TIL pueden exhibir una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la expresión de CD27+, la expresión de CD28+, telómeros más largos, expresión de CD57 aumentada y expresión de CD56 disminuida. en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de dicha segunda población de células.

Las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de dicha tercera población de TIL pueden exhibir una expresión de CD57 aumentada y una expresión de CD56 disminuida con respecto a las células T efectoras y/o células T de memoria central obtenidas de dicha segunda población de células.

También se divulga en el presente documento un procedimiento para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que comprende las etapas de (a) agregar fragmentos de tumor tratados a un sistema cerrado; (b) realizar una primera expansión de dicha primera población de TIL en un primer medio de cultivo celular para obtener una segunda población de TIL, en donde dicho primer medio de cultivo celular comprende IL-2, en donde dicha primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área superficial permeable a los gases, en donde dicha primera expansión se realiza dentro de un primer período de alrededor de 3-14 días para obtener una segunda población de TIL, en donde dicha segunda población de TIL es al

- menos 50 veces mayor en número que dicha primera población de TIL, y en donde la transición de la etapa (a) a la etapa (b) se produce sin abrir el sistema; (c) expandir dicha segunda población de TIL en un segundo medio de cultivo celular, en donde dicho segundo medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno, en donde dicha expansión se realiza dentro de un segundo período de alrededor de 7- 14 días para obtener una tercera población de TIL, en donde dicha tercera población de TIL exhibe una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central con respecto a la segunda población de TIL, en donde dicha expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable a los gases, y en donde la transición de la etapa (b) a la etapa (c) se produce sin abrir el sistema; (d) recolectar dicha tercera población de TIL obtenida de la etapa (c), en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) ocurre sin abrir el sistema; y (e) transferir dicha población de TIL recolectada de la etapa (d) a una bolsa de infusión, en donde dicha transferencia de la etapa (d) a (e) ocurre sin abrir el sistema.
- El procedimiento puede comprender además la etapa de crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada usando un procedimiento de crioconservación. El procedimiento de crioconservación se puede realizar usando una relación 1:1 de población de TIL recolectada a medio CS10.
- Las células presentadoras de antígenos pueden ser células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células presentadoras de antígenos pueden ser células presentadoras de antígenos artificiales.
- La recolección en la etapa (d) se puede realizar usando un sistema de tratamiento de células LOVO.
- Los fragmentos múltiples pueden comprender alrededor de 50 fragmentos, en los que cada fragmento tiene un volumen de alrededor de 27 mm³. Los múltiples fragmentos pueden comprender desde alrededor de 30 a alrededor de 60 fragmentos con un volumen total de alrededor de 1300 mm³ a alrededor de 1500 mm³. Los múltiples fragmentos pueden comprender alrededor de 50 fragmentos con un volumen total de alrededor de 1350 mm³. Los múltiples fragmentos pueden comprender alrededor de 50 fragmentos con una masa total de alrededor de 1 gramo a alrededor de 1.5 gramos.
- El segundo medio de cultivo celular se puede proporcionar en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un recipiente G y una bolsa de células Xuri.
- La bolsa de infusión en la etapa (e) puede ser una bolsa de infusión que contenga HypoThermosol.
- El primer período en la etapa (b) y dicho segundo período en la etapa (c) pueden realizarse cada uno individualmente dentro de un período de 10 días, 11 días o 12 días. El primer período en la etapa (b) y dicho segundo período en la etapa (c) pueden realizarse cada uno individualmente dentro de un período de 11 días.
- Las etapas (a) a (e) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 25 días a alrededor de 30 días. Las etapas (a) a (e) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 20 días a alrededor de 25 días. Las etapas (a) a (e) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 20 días a alrededor de 22 días. Las etapas (a) a (e) se pueden realizar en 22 días o menos. Las etapas (a) a (e) y la crioconservación se pueden realizar en 22 días o menos.
- Las etapas (b) a (e) se pueden realizar en un único sistema cerrado, en donde la realización de las etapas (b) a (e) en un solo recipiente da como resultado un aumento en el rendimiento de TIL por tumor extirpado en comparación con la realización de las etapas (b) a (e) en más de un recipiente.
- Las células presentadoras de antígeno se pueden agregar a los TIL durante el segundo período en la etapa (c) sin abrir el sistema.
- Las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de dicha tercera población de TIL pueden exhibir una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la expresión de CD27+, la expresión de CD28+, telómeros más largos, la expresión de CD57 aumentada y la expresión de CD56 disminuida. en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de dicha segunda población de células.
- Las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de dicha tercera población de TIL pueden exhibir expresión de CD57 aumentada y expresión de CD56 disminuida en relación con las células T efectoras y/o células T de memoria central obtenidas de dicha segunda población de células.
- El riesgo de contaminación microbiana se puede reducir en comparación con un sistema abierto.
- Los TIL de la etapa (e) se pueden infundir a un paciente.
- El recipiente cerrado puede comprender un solo biorreactor. El recipiente cerrado puede comprender un G-REX-10. El recipiente cerrado puede comprender un G-REX-100. El recipiente cerrado puede comprender un G-Rex 500. El recipiente cerrado puede comprender una bolsa permeable al gas del biorreactor Xuri o Wave.

La presente divulgación proporciona un procedimiento para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) a una población terapéutica de TIL que comprende:

(b) agregar fragmentos tumorales a un sistema cerrado en donde los fragmentos tumorales comprenden una primera población de TIL;

5 (c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;

10 (d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;

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

(f) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (e) a una bolsa de infusión, en donde la transferencia de la etapa (e) a la (f) ocurre sin abrir el sistema.

El procedimiento también puede comprender como primera etapa:

20 (a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un paciente convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor.

El procedimiento puede ser in vitro o ex vivo.

La presente divulgación puede proporcionar un procedimiento para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) a una población terapéutica de TIL, que comprende:

25 (a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un paciente convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor;

(b) agregar los fragmentos de tumor a un sistema cerrado;

30 (c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;

35 (d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;

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

(f) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (e) a una bolsa de infusión, en donde la transferencia de la etapa (e) a la (f) ocurre sin abrir el sistema.

50 El procedimiento puede ser in vitro o ex vivo.

El procedimiento puede comprender además la etapa de crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada en la etapa (f) usando un procedimiento de crioconservación.

El procedimiento de crioconservación se puede realizar usando una relación 1:1 de población de TIL recolectada al medio de crioconservación. Los medios de crioconservación pueden comprender dimetilsulfóxido. Los medios de crioconservación se pueden seleccionar del grupo que consiste en Cryostor CS10, HypoThermasol o una combinación de los mismos.

- 5 Las células presentadoras de antígenos pueden ser células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Las PBMC pueden irradiarse y ser alogénicas.

Las PBMC se pueden agregar al cultivo celular en cualquiera de los días 9 a 14 en la etapa (d).

Las células presentadoras de antígenos pueden ser células presentadoras de antígenos artificiales.

La recolección en la etapa (e) puede realizarse usando un sistema de tratamiento de células LOVO.

- 10 Los fragmentos tumorales pueden ser múltiples fragmentos y comprender de alrededor de 4 a alrededor de 50 fragmentos, en los que cada fragmento tiene un volumen de alrededor de 27 mm^3 . Los múltiples fragmentos pueden comprender de alrededor de 30 a alrededor de 60 fragmentos con un volumen total de alrededor de 1300 mm^3 a alrededor de 1500 mm^3 . Los múltiples fragmentos pueden comprender alrededor de 50 fragmentos con un volumen total de alrededor de 1350 mm^3 . Los múltiples fragmentos pueden comprender alrededor de 50 fragmentos con una masa total de alrededor de 1 gramo a alrededor de 1.5 gramos.

El medio de cultivo celular puede proporcionarse en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un recipiente G y una bolsa de células Xuri.

La bolsa de infusión en la etapa (f) puede ser una bolsa de infusión que contenga HypoThermosol.

- 20 El primer período en la etapa (c) y el segundo período en la etapa (e) pueden realizarse cada uno individualmente dentro de un período de 10 días, 11 días o 12 días. El primer período en la etapa (c) y el segundo período en la etapa (e) pueden realizarse cada uno individualmente dentro de un período de 11 días. Las etapas (a) a (f) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 25 días a alrededor de 30 días. Las etapas (a) a (f) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 20 días a alrededor de 25 días. Las etapas (a) a (f) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 20 días a alrededor de 22 días.
- 25 Las etapas (a) a (f) se pueden realizar en 22 días o menos. Las etapas (a) a (f) y la crioconservación se pueden realizar en 22 días o menos.

La población terapéutica de TIL recolectada en la etapa (e) puede comprender suficientes TIL para una dosificación terapéuticamente eficaz de los TIL. El número de TIL suficiente para una dosificación terapéuticamente eficaz puede ser de alrededor de 2.3×10^{10} a alrededor de 13.7×10^{10} .

- 30 Las etapas (b) a (e) se pueden realizar en un solo recipiente, en donde realizar las etapas (b) a (e) en un solo recipiente da como resultado un aumento en el rendimiento de TIL por tumor extirpado en comparación con la realización de las etapas (b) a (e) en más de un recipiente.

Las células presentadoras de antígeno se pueden agregar a los TIL durante el segundo período en la etapa (d) sin abrir el sistema.

- 35 Las células T efectoras y/o las células T de memoria central en la población terapéutica de TIL pueden exhibir una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la expresión de CD27+, la expresión de CD28+, telómeros más largos, la expresión de CD57 aumentada y la expresión de CD56 disminuida relativa a células T efectoras y/o células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.

- 40 Las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de la tercera población de TIL pueden exhibir una expresión de CD57 aumentada y una expresión de CD56 disminuida en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.

El riesgo de contaminación microbiana se puede reducir en comparación con un sistema abierto.

Los TIL de la etapa (f) se pueden infundir a un paciente.

- 45 Los múltiples fragmentos pueden comprender alrededor de 4 fragmentos. Los 4 fragmentos se pueden colocar en un G-REX -100. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.5 cm de diámetro. Los 4 fragmentos se pueden colocar en un G-REX -100. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm o 1 cm de diámetro. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm o 1 cm de diámetro y se colocan en un G-REX -100. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm o 1 cm de diámetro y pueden colocarse en un recipiente con un volumen equivalente a un G-REX -100. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.5 cm de diámetro y pueden colocarse en un G-
- 50

REX -100. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.5 cm de diámetro y pueden colocarse en un recipiente con un volumen equivalente a un G-REX-100.

Más detalles de las etapas (a), (b), (c), (d), (e) y (f) se proporcionan más adelante en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, las formas de realización descritas bajo los títulos "ETAPA A: Obtener la muestra de tumor del paciente", "ETAPA B: Primera expansión", "ETAPA C: Primera expansión a la segunda transición de expansión", "ETAPA D: Segunda expansión", "ETAPA E: Recolección de TIL y "ETAPA F: Formulación final/Transferir a bolsa de infusión".

La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar a un sujeto con cáncer, y el procedimiento comprende la administración de linfocitos infiltrantes de tumores expandidos (TIL), que comprenden:

- 5 (a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor;
- (b) agregar los fragmentos de tumor a un sistema cerrado;
- (c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un
15 recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;
- (d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población
20 de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que
25 proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;
- (e) recolectar la población terapéutica de TIL obtenida de la etapa (d), en donde la transición de la etapa (d) a la etapa (e) ocurre sin abrir el sistema; y
- (f) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (e) a una bolsa de infusión, en donde la transferencia
30 de la etapa (e) a la (f) ocurre sin abrir el sistema;
- (g) opcionalmente crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada de la etapa (f) usando un procedimiento de crioconservación; y
- (h) administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL de la bolsa de infusión en la etapa (g) al paciente.
- 35 También se divulga en el presente documento una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la población se puede obtener a partir de un procedimiento que comprende las etapas de:
- (b) agregar fragmentos tumorales a un sistema cerrado en donde los fragmentos tumorales comprenden una primera población de TIL;
- (c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un
40 recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;
- (d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población
45 de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que
50 proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;

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

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

- 5 (g) opcionalmente crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada de la etapa (f) usando un procedimiento de crioconservación.

La población puede obtenerse mediante un procedimiento que también comprende como primera etapa:

(a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un paciente convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor.

- 10 El procedimiento puede ser in vitro o ex vivo.

Cualquiera de las etapas (a) a (f) puede comprender una o más características descritas en el presente documento, por ejemplo, una o más características divulgadas bajo los títulos "ETAPA A: Obtener una muestra de tumor del paciente", "ETAPA B: Primera expansión", "ETAPA C: Primera expansión a la segunda transición de expansión", "ETAPA D: Segunda expansión", "ETAPA E: Recolectar TIL y "ETAPA F: Formulación final/Transferencia a la bolsa de infusión".

- 15 La etapa (g) puede comprender una o más características descritas en el presente documento, por ejemplo, una o más características descritas bajo el título "ETAPA H: Crioconservación opcional de TIL". La etapa (h) comprende una o más características descritas en el presente documento, por ejemplo, una o más características divulgadas bajo el título "ETAPA F: 1 Composiciones farmacéuticas, dosis y regímenes de dosificación".

La población terapéutica de TIL recolectada en la etapa (e) puede comprender suficientes TIL para administrar una dosis terapéuticamente eficaz de los TIL en la etapa (h).

El número de TIL suficientes para administrar una dosis terapéuticamente eficaz en la etapa (h) puede ser de alrededor de 2.3×10^{10} a alrededor de 13.7×10^{10} .

- 25 Las células presentadoras de antígeno (APC) pueden ser PBMC.

Las PBMC se pueden agregar al cultivo celular en cualquiera de los días 9 a 14 en la etapa (d).

Antes de administrar una dosis terapéuticamente eficaz de células TIL en la etapa (h), se puede haber administrado al paciente un régimen de linfodepleción no mieloablativa.

- 30 También se divulga en el presente documento una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para su uso en el tratamiento del cáncer y en combinación con un régimen de linfodepleción no mieloablativa. El régimen de linfodepleción no mieloablativa se puede administrar antes de administrar la población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL).

El régimen de linfodepleción no mieloablativa puede comprender las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m²/día durante dos días seguido de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m²/día durante cinco días.

- 35 Puede haber una etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 de dosis alta comenzando el día después de la administración de las células TIL al paciente en la etapa (h).

También se divulga en el presente documento una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para su uso en el tratamiento del cáncer y en combinación con un régimen de IL-2 de dosis alta. El régimen de dosis alta de IL-2 puede comenzar el día después de la administración de la población terapéutica de células TIL.

- 40 El régimen de IL-2 de dosis alta puede comprender 600,000 o 720,000 UI/kg que se administra como una infusión intravenosa de bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

Las células T efectoras y/o las células T de memoria central en la población terapéutica de TIL pueden exhibir una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la expresión de CD27+, la expresión de CD28+, telómeros más largos, expresión aumentada de CD57 y expresión disminuida de CD56 en relación con células T efectoras y/o células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.

- 45 Las células T efectoras y/o las células T de memoria central en la población terapéutica de TIL pueden exhibir una expresión de CD57 aumentada y una expresión de CD56 disminuida en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) a una población terapéutica de TIL que comprende:

(a) agregar fragmentos de tumor tratados de un tumor extirpado de un paciente a un sistema cerrado para obtener una primera población de TIL;

5 (b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición de la etapa (a) a la etapa (b) ocurre sin abrir el sistema;

10 (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (b) a la etapa (c) se produce sin abrir el sistema;

15 (d) recolectar la población terapéutica de TIL obtenida de la etapa (c), en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) ocurre sin abrir el sistema; y

(e) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (d) a una bolsa de infusión, en donde la transferencia de la etapa (d) al (e) ocurre sin abrir el sistema.

La población terapéutica de TIL recolectada en la etapa (d) puede comprender suficientes TIL para una dosificación terapéuticamente eficaz de los TIL.

25 El número de TIL suficiente para una dosificación terapéuticamente eficaz puede ser de alrededor de 2.3×10^{11} a alrededor de 13.7×10^{10} .

El procedimiento puede comprender además la etapa de crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada usando un procedimiento de crioconservación.

30 El procedimiento de crioconservación se puede realizar usando una relación 1:1 de población de TIL recolectada a medio CS10.

La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar a un sujeto con cáncer y los procedimientos comprenden la administración de linfocitos infiltrantes de tumores expandidos (TIL), que comprenden:

(a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor;

35 (b) agregar los fragmentos de tumor a un sistema cerrado;

(c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;

40 (d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;

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

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

(g) opcionalmente crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada de la etapa (f) usando un procedimiento de crioconservación; y

(h) administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL desde la bolsa de infusión en la etapa (g),

5 en donde no se realiza ninguna selección de la población de TIL durante ninguna de las etapas (a) a (h). En un ejemplo, no se realiza ninguna selección de la segunda población de TIL (la población pre-REP) basada en el fenotipo antes de realizar la segunda expansión de la etapa (d). En un ejemplo, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL o la población de TIL recolectada basada en la expresión de CD8 durante ninguna de las etapas (a) a (h).

10 La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar a un sujeto con cáncer, y el procedimiento comprende la administración de linfocitos infiltrantes de tumores expandidos (TIL), que comprende:

(a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto convirtiendo una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor;

(b) agregar los fragmentos de tumor a un sistema cerrado;

15 (c) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una primera área de superficie permeable a los gases, donde la primera expansión se realiza durante alrededor de 3-14 días para obtener la segunda población de TIL, donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y donde la transición desde la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema;

20 (d) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante alrededor de 7-14 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un recipiente cerrado, lo que proporciona una segunda área superficial permeable al gas, y en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) se produce sin abrir el sistema;

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

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

30 (g) crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada de la etapa (f) usando un procedimiento de crioconservación, en donde el procedimiento de crioconservación comprende mezclar un medio de crioconservación con la población de TIL recolectada;

35 (h) administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de la tercera población de TIL desde la bolsa de infusión en la etapa (g),

40 en donde no se realiza ninguna selección de la población de TIL durante ninguna de las etapas (a) a (h). En un ejemplo, no se realiza ninguna selección de la segunda población de TIL (por ejemplo, la población pre-REP) basada en el fenotipo antes de realizar la segunda expansión de la etapa (d). En un ejemplo, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL o la población de TIL recolectada basada en la expresión de CD8 durante ninguna de las etapas (a) a (h). En algunos ejemplos, el régimen de linfodepleción no mieloablativa se administra antes de administrar la población de TIL recolectada. En algunos ejemplos, el régimen de linfodepleción no mieloablativa comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m²/día durante dos días seguida de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m²/día durante cinco días.

45 En algunos ejemplos, las células presentadoras de antígenos son células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En algunos ejemplos, las PBMC se irradian y son alogénicas. En algunos ejemplos, las PBMC se agregan al cultivo celular en cualquiera de los días 9 a 14 en la etapa (c).

50 Las células presentadoras de antígenos pueden ser células presentadoras de antígenos artificiales.

La recolección en la etapa (d) se puede realizar usando un sistema de tratamiento de células LOVO.

El procedimiento puede comprender la recolección en la etapa (d) mediante un sistema de tratamiento de células LOVO, tal como el sistema LOVO fabricado por Fresenius Kabi. El término "sistema de tratamiento de

células LOVO" también se refiere a cualquier instrumento o dispositivo que pueda bombear una solución que comprende células a través de una membrana o filtro, como una membrana giratoria o un filtro giratorio, en un entorno de sistema estéril y/o cerrado, lo que permite un flujo continuo y tratamiento celular para eliminar el sobrenadante o el medio de cultivo celular sin formación de pellas. En algunos casos, el sistema de tratamiento celular puede realizar la separación celular, lavado, intercambio de fluidos, concentración y/u otras etapas de tratamiento celular en un sistema cerrado y estéril.

Los fragmentos tumorales pueden ser múltiples fragmentos y comprender de alrededor de 4 a alrededor de 50 fragmentos, en los que cada fragmento tiene un volumen de alrededor de 27 mm³. Los múltiples fragmentos pueden comprender de alrededor de 30 a alrededor de 60 fragmentos con un volumen total de alrededor de 1300 mm³ a alrededor de 1500 mm³. Los múltiples fragmentos pueden comprender alrededor de 50 fragmentos con un volumen total de alrededor de 1350 mm³. Los múltiples fragmentos pueden comprender alrededor de 50 fragmentos con una masa total de alrededor de 1 gramo a alrededor de 1.5 gramos.

Los fragmentos múltiples pueden comprender alrededor de 4 fragmentos. Los 4 fragmentos se pueden colocar en un G-REX-100. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm o 1 cm de diámetro. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm o 1 cm de diámetro y se colocan en un G-REX-100. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm o 1 cm de diámetro y se colocan en un recipiente con un volumen equivalente a un G-REX-100. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.5 cm de diámetro y pueden colocarse en un G-REX-100. Los 4 fragmentos pueden tener alrededor de 0.5 cm de diámetro y pueden colocarse en un recipiente con un volumen equivalente a un G-REX-100.

El medio de cultivo celular puede proporcionarse en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un recipiente G y una bolsa de células Xuri.

La bolsa de infusión en la etapa (e) puede ser una bolsa de infusión que contiene HypoThermosol.

El primer período en la etapa (b) y el segundo período en la etapa (c) pueden realizarse cada uno individualmente dentro de un período de 10 días, 11 días o 12 días. El primer período en la etapa (b) y el segundo período en la etapa (c) pueden realizarse individualmente dentro de un período de 11 días. Las etapas (a) a (e) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 25 días a alrededor de 30 días. Las etapas (a) a (e) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 20 días a alrededor de 25 días. Las etapas (a) a (e) se pueden realizar dentro de un período de alrededor de 20 días a alrededor de 22 días. Las etapas (a) a (e) se pueden realizar en 22 días o menos. Las etapas (a) a (e) y la crioconservación se pueden realizar en 22 días o menos.

Las etapas (b) a (e) se pueden realizar en un solo recipiente, en donde realizar las etapas (b) a (e) en un solo recipiente da como resultado un aumento en el rendimiento de TIL por tumor extirpado en comparación con la realización de las etapas (b) a (e) en más de un recipiente.

Las células presentadoras de antígeno se pueden agregar a los TIL durante el segundo período en la etapa (c) sin abrir el sistema.

Las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas en la población terapéutica de TIL pueden exhibir una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la expresión de CD27+, la expresión de CD28+, telómeros más largos, expresión aumentada de CD57 y expresión disminuida de CD56, en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.

Las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas en la población terapéutica de TIL pueden exhibir una expresión aumentada de CD57 y una expresión disminuida de CD56 en relación con las células T efectoras y/o células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.

El riesgo de contaminación microbiana puede reducirse en comparación con un sistema abierto.

Los TIL de la etapa (e) se pueden infundir a un paciente.

El recipiente cerrado puede comprender un solo biorreactor. En algunas formas de realización, el recipiente cerrado comprende un G-REX-10. En algunas formas de realización, el recipiente cerrado comprende un G-REX-100.

EJEMPLOS

Las formas de realización abarcadas en el presente documento se describen ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con el propósito de ilustrar y la divulgación abarcada en este documento no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a estos ejemplos, sino que debe

interpretarse para que abarque todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en este documento.

EJEMPLO 1: ENSAYOS DEL SISTEMA CERRADO

5 Como se analiza en el presente documento, se desarrollaron protocolos y ensayos para generar TIL a partir de tumores de pacientes en un sistema cerrado.

Este ejemplo describe un nuevo procedimiento abreviado para generar números clínicamente relevantes de TIL a partir de tejido tumoral extirpado de pacientes en dispositivos G-REX y crioconservación del producto celular final. En los Ejemplos 2 a 8 se describen aspectos adicionales de este procedimiento.

Definiciones/Abreviaturas

10 BSC - Cabina de seguridad biológica

°C - grados Celsius

CO₂ - Dióxido de carbono

CD3 - Clúster de diferenciación 3

CM1 - Medio completo 1

15 CM2 - Medio completo 2

TIWB - Regulador de pH de lavado para aislamiento de tumores

CM4 - Medio completo 4

CRF - Congelador con velocidad de control

EtOH - etanol

20 GMP - Buenas prácticas de fabricación

IL-2, rIL-2 -Interleucina-2, Interleucina-2 humana recombinante,

IU - Unidad Internacional

L - Litro

LN2 - nitrógeno líquido

25 mL - mililitro

µl - microlitro

mM - milimolar

µm - micrómetro

NA - No aplica

30 PBMC - Célula mononuclear de sangre periférica

PPE - Equipo de protección personal

Pre-REP: cultivos de TIL iniciales que se originan a partir de fragmentos de tumor

REP - Protocolo de expansión rápida

TIL - Linfocitos infiltrantes de tumores

35 TIWB - Regulador de pH de lavado de aislamiento TIL

POE - Procedimiento operativo estándar

Procedimiento

1. Preparación avanzada: Día 0 (Realizado hasta 36 horas antes)

1.1 Se preparó el regulador de pH de lavado de aislamiento de TIL (TIWB) suplementando 500 ml de solución salina equilibrada de Hanks con 50 µg/ml de gentamicina. Para obtener una solución madre de gentamicina de 10 mg/ml, se transfirieron 2.5 ml a HBSS. Para obtener 50 mg/ml de solución madre, se transfirieron 0.5 ml a HBSS.

5 1.2. Medios CM1 preparados con GlutaMax™ según LAB-005 "Preparación de medios para PreREP y REP" para instrucciones de CM2". Almacenar a 4°C hasta 24 horas. Dejar calentar a 37°C durante al menos 1 hora antes de usar.

1.3. Se retiraron las alícuotas de IL-2 del congelador a -20°C y se colocaron las alícuotas en el refrigerador a 2-8°C.

10 2. Recepción de tejido tumoral

2.1. Se conservó toda la documentación recibida con el tejido tumoral y se obtuvieron fotos del contenedor de transporte y del tejido tumoral.

2.2. Si TempTale se proporcionó impreso y se guardó el documento asociado; se guardó el PDF.

15 2.3. Se retiró la muestra de tumor y el recipiente secundario (bolsa con cierre de cremallera) del expedidor y se almacenó a 4°C hasta estar listo para su tratamiento.

2.4 Tumor no utilizado se envió en HypoThermasol o como fragmentos congelados en CryoStor CS10 (ambos disponibles comercialmente en BioLife Solutions, Inc.).

3. Tratamiento de tumores para TIL

20 3.1. Se transfirieron asépticamente los siguientes materiales al BSC, según fuera necesario, y se etiquetaron de acuerdo con la Tabla 3 más adelante.

TABLA 3. Materiales para el aislamiento de tumores.

Ítem	Cantidad mínima	Etiqueta en desarrollo
Tumor	1	N/A
Placa de Petri, 150 mm	1	Dissección
Placa de Petri, 100 mm	4	Lavado 1, 2, 3, 4
Placa de Petri, 100 mm	1	Tejido desfavorable
Placa de 6 pocillos	2	Etiqueta de tapa -"Fragmentos de tumor" fondo de placa - "Tejido favorable"
Regla	2	N/A
Regulador de pH de lavado	1	N/A
Pinzas	1	N/A
Pinzas largas	1	N/A
Bisturí	Según se necesite	N/A

3.2. Se etiquetaron los círculos de las placas de Fragmentos de Tumores con las letras A-J.

3.3. Se etiquetó la parte inferior de los pocillos de las placas de tejidos favorables con las letras A - J.

25 3.4. Se transfirieron 5 ml de gentamicina al matraz de HBSS. Se etiquetó como TIWB.

3.5. Se arremolinó para mezclar.

3.6. Se pipetearon 50 mL TIWB a cada uno de los siguientes:

1. Placa de lavado 1
 2. Placa de lavado 2
 3. Placa de lavado 3
 4. Placa de lavado 4
- 5 3.7. Se pipetearon 2 ml de TIWB a los pocillos A-J de la placa de tejido favorable.
- 3.8. Se cubrieron las placas de tejidos favorables (parte inferior de la placa de 6 pocillos) con la placa de fragmentos tumorales correspondiente (tapa de la placa de 6 pocillos).
- 3.9. Con unas pinzas largas, se extrajo el tumor o los tumores del matraz de muestras y se transfirieron a la placa de lavado 1.
- 10 3.10. Se incubó el tumor a temperatura ambiente en la placa de lavado 1 durante 3 minutos.
- 3.11. Durante la incubación, se volvió a etiquetar el matraz de muestras como "Carga biológica" y se almacenó a 2-8°C hasta que se envió al control de calidad para su análisis.
- 3.12. Se desecharon las pinzas largas y se utilizaron pinzas cortas para manipulaciones posteriores.
- 3.13. Con unas pinzas se transfirió el tumor a la placa de lavado 2.
- 15 3.14. Se incubó el tumor a temperatura ambiente en la placa de lavado 2 durante 3 minutos.
- 3.15. Con unas pinzas se transfirió el tumor a la placa de lavado 3.
- 3.16. Se incubó el tumor a temperatura ambiente en la placa de lavado 3 durante 3 minutos.
- 3.17. Se retiraron las placas de fragmentos tumorales (tapas de placa de 6 pocillos) de las placas de tejidos favorables (fondos de placa de 6 pocillos) y se colocaron las placas de fragmentos tumorales boca abajo sobre la superficie de la BSC.
- 20 3.18. Con una pipeta de transferencia, se agregaron alrededor de 4 gotas individuales espaciadas uniformemente de TIWB a cada círculo de las placas de fragmentos tumorales.
- 3.19. Se colocó una regla debajo de la placa de disección.
- 3.20. Con unas pinzas se transfirió el tumor a la placa de disección.
- 25 3.21. Usando la regla debajo de la placa de disección, se midió y se registró la longitud del tumor.
- 3.22. Para los tumores de más de 1 cm se hicieron placas de tejido favorable adicionales.
- 3.23. Se realizó una disección inicial de las piezas tumorales en la placa de disección en 10 piezas intermedias y se tuvo cuidado de conservar la estructura tumoral de cada pieza intermedia.
- 3.24. Se transfirieron las piezas de tumor intermedias que no se diseccionaron activamente en fragmentos a la placa de lavado 4 para garantizar que el tejido permaneciera hidratado durante todo el procedimiento de disección.
- 30 3.25. Trabajando con una pieza de tumor intermedia a la vez, se cortó cuidadosamente el tumor en fragmentos de hasta 3x3x3 mm en la placa de disección, usando la regla debajo de la placa como referencia. Cuando el bisturí se desafiló, se reemplazó por un bisturí nuevo.
- 35 3.26. Se continuó diseccionando fragmentos de la pieza de tumor intermedia hasta que se evaluó todo el tejido de la pieza intermedia.
- 3.27. Se seleccionaron los fragmentos favorables y usando una pipeta de transferencia se transfirieron hasta 4 fragmentos favorables a las gotas de TIWB en un círculo en la placa de Fragmentos de Tumores.
- 40 3.28. Con una pipeta de transferencia, se transfirieron los fragmentos favorables restantes de la pieza tumoral, cuando estuvieron disponibles, al pocillo correspondiente en la placa de tejido favorable.
- 3.29. Con una pipeta de transferencia, se transfirieron la mayor cantidad posible del tejido desfavorable y el producto de desecho a la placa de tejido desfavorable para limpiar la placa de disección. El tejido desfavorable se indicó mediante tejido adiposo amarillo o tejido necrótico.

3.30. Se continuó el tratamiento repitiendo la etapa 7.3.25-7.3.30 para las piezas tumorales intermedias restantes, trabajando una pieza intermedia a la vez hasta que se hubo tratado todo el tumor.

5 3.31. Si estaban disponibles menos de 4 fragmentos tumorales en el círculo correspondiente de la placa de fragmentos tumorales, era aceptable usar fragmentos de un pocillo no correspondiente de la placa de tejido favorable como disponibles para lograr el objetivo de 40 fragmentos. Cuando fueron menos de 40 fragmentos, se colocaron 10-40 en un matraz G-Rex 100M individual.

4. Matraz de siembra G-Rex 100M

4.1. Se transfirieron asépticamente los siguientes materiales al BSC, según fuera necesario, y se etiquetaron de acuerdo con la Tabla 4 más adelante.

10 TABLA 4. Materiales adicionales para matraces de siembra.

Ítem	Cantidad mínima	Etiqueta en desarrollo
Matraz G-Rex de 100M	Según sea necesaria	Lote#
CM 1 caliente	Según sea necesaria	Lote#
Alícuotas de IL-2	Según sea necesaria	Lote#

4.2. Se suplementó cada litro de CM1 con 1 ml de solución madre de IL-2 (6×10^6 UI/ml).

4.3. Se colocaron 1000 ml de CM1 precalentado que contenía 6000 UI/ml de IL-2 en cada biorreactor G-REX 100M necesario según lo determinado en la Tabla 5 más adelante.

15 4.4. Con una pipeta de transferencia, se transfirió el número apropiado de fragmentos de tumor a cada matraz G-Rex 100M, distribuyendo los fragmentos según la Tabla 5.

4.5. Cuando uno o más fragmentos de tumor se transfirieron al flote en el matraz G-Rex 100M, se obtuvo un fragmento de tumor adicional, si estaba disponible, en la placa de tejido favorable y se transfirió al matraz G-Rex 100M.

20 4.6. Se registró el número total de fragmentos agregados a cada matraz.

4.7. Se desechó la placa de tejido desfavorable.

4.8. Se colocó cada biorreactor G-REX 100M en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C.

4.9. Cuando hubo más de 40 fragmentos disponibles:

25 4.9.1. Cuando se obtuvieron > 41 fragmentos, se colocaron 1000 ml de CM1 completo precalentado en un segundo biorreactor G-REX 100M.

TABLA 5. Número de biorreactores G-REX necesarios.

Número de fragmentos	G-REX	Número de G-REX	CM1 necesario
1-40	G-REX 100M	1	1000 mL
41-80 distribuidos entre matraces	G-REX 100M	2	2000 mL
>80	Congelar fragmentos en CS10 después de incubación de 15 minutos		

5. Preparación avanzada: día 11 (preparada con hasta 24 horas de anticipación)

30 5.1. Se prepararon 6 L de CM2 con GlutaMax. Se utilizaron procedimientos de laboratorio de referencia para "Preparación de medios para PreREP y REP" para instrucciones de CM2". Se calentó a 37°C 1 hora antes de su uso.

5.2. Alícuotas de IL-2 descongeladas: se retiraron las alícuotas de IL-2 del congelador y se colocaron a 4°C.

6. Recolección de TIL (día 11)

6.1. Se retiraron con cuidado los matraces G-REX -100M de la incubadora y se colocaron en BSC2. Se tuvo cuidado de no perturbar las células del fondo del matraz.

5 6.2. Utilizando GatherRex o una bomba peristáltica, se aspiró alrededor de 900 ml de sobrenadante de cultivo celular del (los) matraz(ces).

6.3. Los TIL se resuspendieron agitando suavemente el matraz. Se observó que todas las células se habían liberado de la membrana.

10 6.4. Usando una bomba peristáltica o GatherRex se transfirió la suspensión de células residuales a un paquete de transferencia de sangre del tamaño adecuado (300-1000 ml). Se tuvo cuidado de no permitir que los fragmentos se transfirieran al paquete de transferencia de sangre.

6.5. Se agarró el paquete de transferencia con un conjunto de transferencia de plasma de 4" (se aseguró de que la abrazadera estuviera cerrada).

15 6.6. Se masajeó el paquete para asegurarse de que la suspensión de células se hubiera mezclado bien y, con una jeringa de 3 ml, se eliminó 1 ml de suspensión de TIL para el recuento de células. Se sujetó el tubo y se volvió a tapar el conector luer hembra con una nueva tapa luer estéril.

6.7. Se colocó el paquete de transferencia en una bolsa de plástico con cierre de cremallera y se volvió a colocarlo en la incubadora hasta estar listo para usar.

7. Preparación de los medios

20 7.1. Se dejó que el medio se calentara a 37°C durante > 1 hora.

7.2. Se agregaron 3 ml de solución madre de rhIL-2 6×10^6 UI/ml a 6 L de CM2 para alcanzar una concentración final de 3000 UI/ml de rhIL-2. Se etiquetó como "CM2 completo".

7.3. Se unió estéril un equipo de transferencia de plasma de 4" con luer hembra a un paquete de transferencia de 1L.

25 7.4. Se transfirieron 500 ml de CM2 completo a un paquete de transferencia de 1 L. Se separó el equipo de transferencia de fluido o la jeringa y se conectó un tapón luer estéril al puerto luer hembra.

7.5. Se agarró el paquete con un acoplador de sitio de muestra.

30 7.6. Usando una jeringa de 1.0 ml con aguja, se extrajo 150 µL de 1 mg/ml de anti-CD3 (clon OKT3) y se transfirió a 500 ml de "CM2 completa" a través del acoplador del sitio de la muestra. Se retiró la jeringa para asegurarse de que todo el reactivo se hubiera eliminado de la línea. Se almacenó a 37°C hasta su uso.

8. Preparación del matraz

8.1. Se transfirieron 4.5L de "CM2 completo" a un matraz G-REX -500M usando las graduaciones en el matraz como referencia.

8.2. Se colocó el matraz en una incubadora a 37°C hasta estar listo.

35 9. Descongelar alimentadores irradiados

9.1. Se utilizaron $5,0 \times 10^9$ alimentadores irradiados alogénicos de dos o más donantes para su uso.

9.2. Se retiraron los alimentadores del congelador LN2 y se colocaron en una bolsa de transporte de riesgo biológico.

40 9.3. Con las bolsas de alimentación en la bolsa de transporte de riesgo biológico, los alimentadores se descongelaron en una incubadora a 37°C o en un baño de cuentas. Las bolsas se mantuvieron estáticas y sumergidas. Se retiraron los alimentadores del baño cuando estaban casi completamente descongelados, pero aún estaban fríos.

45 9.4. Se rociaron o se limpiaron las bolsas de alimentación con EtOH al 70% y se colocaron en BSC2. Se agregó cada bolsa de alimentación directamente al G-Rex 500M abierto para asegurar un número suficiente de células irradiadas (5×10^9 células, +/- 20%).

9.5. Ambas abrazaderas se cerraron en un conector tipo Y fenwal con cierre luer macho.

- 9.6. Cada bolsa de alimentación se agarró con una pata del conector en Y.
- 9.7. Se retiró el paquete de transferencia de 1 l con 500 ml de "CM2 completo" + OKT3 y se transfirió a BSC.
- 9.8. Se conectó asépticamente una jeringa de 60 ml a una llave de paso de 3 vías y se conectó asépticamente el paquete de transferencia al extremo macho de la llave de paso.
- 5 9.9. Se acopló asépticamente el conector en Y a la llave de paso de 3 vías.
- 9.10. Se extrajo todo el contenido de las bolsas de alimentación a la jeringa, se registró el volumen y se despacharon 5.0×10^9 alimentadores irradiados alogénicos al paquete de transferencia.
- 9.11. Se sujetó y se separó el paquete de transferencia del aparato y se conectó el cierre luer hembra con un nuevo tapón luer estéril.
- 10 9.12. Usando una jeringa de aguja y 3 mL se extrajo 1 mL para el recuento de células del acoplador del sitio de la muestra.
- 9.13. Se procedió cuando se alcanzó $\pm 10\%$ del número de células diana (5.0×10^9) con $> 70\%$ de viabilidad.
- 9.14. Cuando se alcanzó menos del 90% del número de células diana (5.0×10^9) con $> 70\%$ de viabilidad, se descongeló otra bolsa y se repitió 7.9.4-7.9.12. Cuando se alcanzó más de 110% del número de células diana, se calculó el volumen adecuado requerido para la dosis de células deseada y se procedió.
- 15 10. Cocultivar TIL y alimentadores en matraz G-REX 500M
- 10.1. Se retiró el matraz G-REX 500M que contenía el medio preparado de la incubadora y se colocó en la BSC2.
- 10.2. Se adjuntó el paquete de transferencia del alimentador al G-REX -500M y se permitió que el contenido de la bolsa drenara en el 500M.
- 20 10.3. Se retiró la suspensión de TIL de la incubadora y se colocó en la BSC.
- 10.4. Se calculó el volumen de suspensión de TIL a agregar para conseguir 200×10^6 células viables totales.
- $(TVC/mL) / 200 \times 10^6 = mL$
- 10.5. Cuando los TIL estuvieron entre $5-200 \times 10^6$ células viables totales, se añadieron todos los TIL (volumen total) al G-REX -500M. Cuando el recuento de TIL fue superior a 200×10^6 células viables totales, se añadió el volumen calculado necesario para que 200×10^6 TIL se distribuyeran a un G-REX -500M individual. Los TIL restantes se centrifugaron y congelaron en al menos dos crioviales hasta 10^8 /ml en CS10, se etiquetaron con la identificación de los TIL y la fecha de congelación.
- 25 10.6. Se colocó el G-REX -500M en una incubadora de CO_2 al 5% a $37^\circ C$ durante 5 días.
- 30 11. Preparación avanzada: día 16-18
- 11.1. Se calentó 1 bolsa de 10 L de AIM V para cultivos iniciados con menos de 50×10^6 TIL calentado 2 para aquellos iniciados con más de 50×10^6 TIL a $37^\circ C$ al menos 1 hora o hasta que estén listos para usar.
12. Realizar el recuento de células TIL: días 16-18
- 12.1. Se retiró el matraz G-REX -500M de la incubadora y se colocó en BSC2. Se tuvo cuidado de no alterar el cultivo celular en el fondo del matraz.
- 35 12.2. Se retiraron asépticamente 4 L de medio de cultivo celular del matraz G-REX -500M y se colocaron en un recipiente estéril.
- 12.3. Se hizo girar el G-REX -500M hasta que todo el TIL se hubiera resuspendido de la membrana.
- 12.4. Usando GatherRex o una bomba peristáltica se transfirió la suspensión de células a un paquete de transferencia de 2 litros. Se conservó el matraz de 500M para su uso posterior. Se selló el puerto con el acoplador del sitio de muestreo para evitar la pérdida de TIL.
- 40 12.5. Se agarró el paquete de transferencia con un acoplador para el lugar de la muestra y, utilizando una jeringa de 3 ml y una aguja, se extrajeron 2 muestras independientes de 1 ml para realizar un recuento de células.

12.6. Se calculó el número total de matraces necesarios para el subcultivo de acuerdo con la siguiente fórmula. Fracciones redondeadas hacia arriba.

Células viables totales/ 1.0×10^9 = matraz #

13. Preparar CM4

- 5 13.1. Se preparó una bolsa de 10L de AIM-V por cada dos matraces de 500M necesarios. Medios adicionales calentados según sea necesario.

13.2. Por cada 10 L de AIM-V necesarios, se agregaron 100 mL de GlutaMAX para hacer CM4.

13.3. Medio CM4 suplementado con rhIL-2 para una concentración final de 3.000 UI/ml de rhIL-2.

14. Dividir el cultivo celular

- 10 14.1. Usando las graduaciones en el matraz, se llenó a gravedad cada G-REX -500M a 5 L.

14.2. Se distribuyó uniformemente el volumen TIL entre el número calculado de G-REX -500Ms.

14.3. Se colocaron los matraces en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C hasta la recolección el día 22 de REP.

15. Preparación avanzada: día 22-24

- 15 15.1. Se prepararon 2 l de regulador de pH de lavado de HSA al 1% agregando 40 ml de HSA al 25% a cada una de las dos bolsas de 1 l de PlasmaLyte A 7.4. Se agruparon en una bolsa auxiliar LOVO.

15.2. Se suplementaron 200 ml CS10 con IL-2 a 600 UI/ml.

15.3. Se enfriaron previamente cuatro botes de aluminio para congelador de 750 ml a 4°C.

16. Recolectar TIL: Día 22-24

- 20 16.1. Se retiraron los matraces G-REX -500M de la incubadora a 37°C y se colocaron en la BSC2. Se tuvo cuidado de no alterar el cultivo celular en el fondo del matraz.

16.2. Se aspiraron y descartaron 4.5 L de sobrenadante de cultivo celular de cada matraz.

16.3. Se giró el matraz G-REX -500M para resuspender completamente los TIL.

16.4. Se pesó la bolsa de bioprocedimientos de 3-5 L antes de su uso.

- 25 16.5. Usando GatherRex o una bomba peristáltica, se recolectó TIL en la bolsa de bioprocedimientos.

16.6. Se mezcló bien la bolsa y con una jeringa de 3 ml se tomaron 2 muestras de 2 ml del puerto de muestra de la jeringa para el recuento de células.

16.7. Se pesó la bolsa y se encontró la diferencia entre el peso inicial y final. Se usó el siguiente cálculo para determinar el volumen de suspensión celular.

- 30 $\text{Peso neto de la suspensión celular (mL)} / 1.03 = \text{volumen (mL)}$

17. Filtrar TIL y preparar la bolsa de fuente LOVO

17.1. Se colocó la bolsa que contiene el cultivo celular en la BSC2.

17.2. Se colocó un filtro de sangre de 170 µm en la BSC2 y se cerraron todas las abrazaderas.

17.3. Se unió estéril una extremidad fuente del filtro a la suspensión celular.

- 35 17.4. Se pesó una nueva bolsa de bioprocedimientos de tamaño apropiado (a esto se le denominó bolsa fuente LOVO).

17.5. Se unió estéril el extremo terminal del filtro a la bolsa de fuente LOVO.

17.6. Se elevó la suspensión celular colgando las células en un portasueros IV para establecer una transferencia de células por flujo de gravedad.

- 40 Nota: (No se permitió que la bolsa de la fuente cuelgue del aparato de filtración).

17.7. Se abrieron todas las abrazaderas necesarias y se permitió que los TIL drenaran de la bolsa de suspensión celular a través del filtro y a la bolsa fuente LOVO.

17.8. Una vez que todas las células se transfirieron a la bolsa de la fuente de LOVO, se cerraron todas las abrazaderas y se selló el tubo de la bolsa de la fuente de LOVO para quitar el filtro.

5 17.9. Se pesó la bolsa de origen LOVO y se calculó el volumen.

17.10. La bolsa de origen LOVO estaba lista para LOVO.

17.11. Se retiró la bolsa de producto final LOVO del kit desechable sellando el tubo cerca de la bolsa.

18. Formular TIL 1:1 en CS10 frío suplementado con 600 UI/ml de rhIL-2

18.1. Se calculó el número requerido de bolsas criogénicas necesarias.

10 $(\text{volumen de producto celular} \times 2) / 100 = \text{número de bolsas requeridas (redondeo hacia abajo)}$

18.2. Se calculó el volumen a despachar en cada bolsa.

$(\text{volumen de producto celular} \times 2) / \text{número de bolsas requeridas} = \text{volumen para agregar a cada bolsa}$

18.3. Se transfirieron asépticamente los siguientes materiales de la Tabla 6 al BSC.

TABLA 6. Materiales para la crioconservación de TIL.

Ítem	Cantidad mínima	Etiqueta en desarrollo
Producto celular	1	Lote#
Cassette de congelador de aluminio (750 ml)	1	n/a
CS10 frío + IL-2 a 600IU/mL	Como se necesite	Lote#
Dispositivo de conexión celular CC1	1	n/a
Crio-bolsas de 750 mL	calculada	Etiquetar alícuotas 1-la más grande#
Jeringa de 100 mL	#criobolsas +1	n/a
Llave de paso de 3 vías	1	n/a
Crioviales	5	TIL Cryo-product satellite vials

15

19. Formulación de TIL

19.1. Se cerraron todas las abrazaderas en conexión celular CC1.

20

19.2. Al dispositivo de conexión celular se adjunta asépticamente el producto final LOVO, el cierre luer de la bolsa CS10 y el número apropiado de bolsas criogénicas. Se reemplazó la jeringa de 60 ml con una jeringa de 100 ml.

19.3. La cantidad de volumen de CS10 necesaria era equivalente al volumen de la bolsa de producto final LOVO.

25

19.4. Se abrió la ruta de la llave de paso y se desenganchó la línea entre la bolsa de producto final LOVO y la jeringa para tirar de CS10 a la jeringa, volvió a sujetar la vía de CS10. Se abrió la vía hacia la bolsa de la célula para empujar CS10 dentro de la bolsa de producto final LOVO. Se usó la jeringa para medir el volumen agregado a la bolsa de producto final LOVO. Se repitió según fue necesario con una jeringa nueva hasta que se transfirió la cantidad deseada de CS10.

19.5. Se mezcló bolsa de producto final LOVO por inversión.

19.6. Se reemplazó la jeringa de 100 ml

30

19.7. Una a la vez se abrieron las abrazaderas en bolsas criogénicas de 750 ml

19.8. Solo se abrieron las abrazaderas que están directamente asociadas con el producto formulado y la bolsa criogénica en uso.

19.9. Se usó la jeringa de 100 ml para medir el volumen de producto formulado que conduce a la bolsa criogénica.

5 19.10. Se transfirieron 100 ml de producto formulado a cada bolsa criogénica.

19.11. Después de la adición a cada bolsa, se retiró la jeringa para eliminar todas las burbujas de aire de las bolsas criogénicas y se volvió a sujetar la línea asociada.

19.12. En la última bolsa, se retiró un retenedor de 10 ml para la prueba de CC.

19.13. Se selló cada bolsa criogénica, dejando la menor cantidad de tubos posible.

10 19.14. Se retiró la jeringa que contenía la muestra retenida y se transfirió a un tubo cónico de 50 ml; se transfirieron 1,5 ml a crioviales individuales y se congeló en un congelador de velocidad controlada.

19.15. Se transfirieron las bolsas selladas a 4°C mientras se preparaban las etiquetas.

19.16. Se etiquetó cada bolsa criogénica con la descripción del producto, el nombre y la fecha, el volumen, el recuento de células y la viabilidad.

15 19.17. Se colocó cada bolsa criogénica en botes preenfriados de aluminio para congelador.

20. Crioconservación de TIL usando congelador de velocidad controlada (CRF)

20.1. Se siguió el procedimiento estándar para el congelador de velocidad controlada.

20.2. Después de usar el CRF, se almacenaron las bolsas criogénicas en nitrógeno líquido (LN₂).

21. Resultados esperados determinados y criterios de aceptación de la medida.

20 EJEMPLO 2: PROCEDIMIENTO EJECUTADO EN 8 TUMORES DE PACIENTE

El procedimiento del Ejemplo 1 se ejecutó usando 8 tumores de pacientes para producir 8 lotes de TIL. Se obtuvo una buena recuperación del cultivo, viabilidad, recuentos celulares, liberación de CD3⁺ (que indica el % de contenido de células T) e IFN-gamma (IFN-g o IFN-γ), como se muestra en la Tabla 7 más adelante y en la Figura 7 a la Figura 10.

25 TABLA 7. Resultados de las pruebas de identidad, potencia y viabilidad/recuperación del procedimiento del ejemplo 1.

IFNg (pg/1e6 células/ 24hr)		CD3 (%)		Células/mL (Viabiles+No-viables)		% de recuperación	% de viabilidad	
						Fresco/Lovo		
M1061 T	4570		95.3	1.27E+08		103	88.1	
M1062 T	3921		99.7	1.65E+08		89	84.5	
M1063 T	5587		98.7	1.51E+08		112	82.1	
M1064 T	619		84.5	1.75E+08		83	86.8	
M1065 T	1363		96.8	3.42E+07		128	76.4	
EP110 01T	4263		90.4	1.82E+08		92	77.9	
M1056 T	6065		94.2	2.11E+08		85	84.8	
M1058 T	1007		99	2.72E+08		89	87.5	

EJEMPLO 3: ESCALABILIDAD DEL PROCEDIMIENTO TIL MODIFICADO

Los estudios presentados aquí se realizaron en un laboratorio de desarrollo de procedimientos (PD) y, posteriormente, se realizó un estudio de calificación de procedimientos (PQ) utilizando ejecuciones de ingeniería en la suite de sala limpia de GMP en una instalación de fabricación. Se completaron tres ejecuciones de PQ/ingeniería en la sala limpia de la instalación de GMP de acuerdo con un protocolo de calificación y un registro de lote basado en los estudios de DP presentados aquí. Los criterios de aceptación para las ejecuciones de ingeniería se establecieron de manera prospectiva. El estudio PQ se resume con más detalle más adelante, y los resultados de las pruebas obtenidos para los lotes de ingeniería se proporcionan en las siguientes secciones.

El número de células generadas a partir de cultivos del protocolo de expansión rápida previa (pre-REP) a menudo excedía de 100×10^6 células viables. Además, la inclusión de un ciclo de congelación-descongelación entre las etapas de cultivo Pre-REP y REP redujo el rendimiento de células viables. Al eliminar la etapa de crioconservación en desarrollo, el REP podría iniciarse de manera confiable y regular con un mayor número de TIL. Este cambio permitió que la duración del REP se redujera en una cantidad proporcional de tiempos de duplicación celular a alrededor de 11 días sin afectar la dosis celular. Además, el tiempo de cultivo reducido desde la activación hasta la recolección da como resultado un producto menos diferenciado y potencialmente más capaz de persistir in vivo (Tran 2008).

El estudio de PD validó el inicio del cultivo de REP con hasta 200×10^6 células con un número fijo de células alimentadoras. Más adelante, se evaluó el momento óptimo para recolectar el cultivo REP durante 9 a 14 días. Los cultivos se sembraron en relaciones de alimentador a TIL en el intervalo de 100:1 a 25:1. La optimización del tiempo de recolección se determinó midiendo el recuento celular total, la viabilidad, el inmunofenotipo, el consumo de medios, el análisis de metabolitos, el análisis de interleucina-2 (IL-2) y los análisis funcionales que se describen más adelante.

Se evaluó la inmunofenotipificación de células al final del cultivo de REP sobre la base de los marcadores enumerados en la Tabla 8 más adelante. Se evaluó el estado de activación y diferenciación fenotípica de las células. No se observaron diferencias estadísticas en el fenotipo entre ninguna de las condiciones experimentales.

TABLA 8. Marcadores de activación y diferenciación ensayados en cultivos de optimización de procedimientos.

Diana	Etiqueta para detección	Clon
Panel 1		
TCRab (<i>i.e.</i> , TCR α/β)	PE/Cy7	IP26
CD57	PerCP-Cy5.5	HNK-1
CD28	PE	CD28.2
CD4	FITC	OKT4
CD27	APC-H7	M-T271
CD56	APC	N901
CD8a	PB	RPA-T8
Panel 2		
CD45RA	PE/Cy7	HI100
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2
CCR7	PE	150503
CD8	FITC	HIT8
CD4	APC/Cy7	OKT4
CD38	APC	HB-7
HLA-DR	PB	L243

Panel 3		
CD137	PE/Cy7	4B4-1
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2
Lag3	PE	3DS223H
CD8	FITC	HIT8
CD4	APCCy7	OKT4
PD1	APC	EH12.2H7
Tim-3	BV421	F38-2E2

Abreviaturas: PE/Cy7= ficoeritrina: Cy-7 conjugado en tándem; PerCP-Cy5.5= peridina-clorofila-proteína Complejo: CY5.5 Conjugado; PE= ficoeritrina;

FITC= conjugado fluoresceína isotiocianato; APC-H7= alofocianina: H7 conjugado en tándem; APC= alofocianina; PB=Pacific Blue™

El consumo de medios y la producción de metabolitos se mantuvieron dentro de los límites tolerables para todas las condiciones analizadas; y los niveles de IL-2 permanecieron por encima de 150 UI/ml de sobrenadante de cultivo (datos no mostrados).

- 5 Se entiende que la destrucción de las células tumorales por las células T está mediada por la activación del receptor de las células T en la célula T efectora en respuesta a los péptidos presentados en la superficie de las células tumorales. Las células T expandidas ex vivo deben conservar la capacidad de activarse y proliferar en respuesta a la activación de TCR si han de persistir in vivo tras la infusión y mediar la regresión del tumor.
- 10 Para evaluar el potencial de activación de las células cultivadas, los TIL recolectados en diferentes puntos de tiempo se reactivaron con PBMC alogénicas irradiadas cargadas con OKT3. Los cultivos de TIL se recogieron después de 7 días y se ensayaron para determinar la expansión múltiple. Los resultados de este estudio se resumen en la TABLA 9.

TABLA 9. Resumen de resultados: Proliferación de post-REP TIL tras re-cultivo con PBMC alogénicas cargadas con OKT3.

Día de recolección	Expansión múltiple	SD	Valor p (prueba 't' de Student)
Experimento 1			
Día 9	43	6.088	NA
Día 10	48	3.105	NA
Día 11	71	11.137	0.135
Día 14	60	6.995	
Experimento 2			
Día 9	44	6.276	NA
Día 10	27	4.762	NA
Día 11	72	18.795	0.045
Día 14	41	7.050	
Experimento 3			
Día 9	54	5.810	NA
Día 10	54	9.468	NA

Día de recolección	Expansión múltiple	SD	Valor p (prueba 't' de Student)
Día 11	65	1.674	0.071
Día 14	50	8.541	

Este estudio demostró que el potencial de activación de TIL en este ensayo aumentó con cada día de cultivo hasta el día 11 (días de recolección 9-11). Las células recolectadas el día 11 del procedimiento modificado se realizaron de manera similar al control TIL mantenido en cultivo durante 14 días similar al procedimiento actual.

- 5 Estos estudios demostraron la escalabilidad del procedimiento de TIL modificado y establecieron un intervalo aceptable de relaciones de siembra de TIL a células alimentadoras. Además, se encontró que las características de crecimiento persistían hasta el día 14 de cultivo, mientras que las condiciones de cultivo permanecieron óptimas hasta el día 11. Las condiciones ensayadas no mostraron ningún efecto medible sobre el fenotipo TIL. Las células recolectadas en el día 11 del cultivo REP demostraron la mejor capacidad para responder a la reactivación mientras las condiciones del cultivo celular permanecieron dentro de las tolerancias.
- 10 Estos cambios se adoptaron y validaron a escala completa con la división del cultivo que se produjo el día 5 y la recolección el día 11.

- 15 Se pusieron en práctica ejecuciones de ingeniería en la instalación de desarrollo de procedimientos con el fin de ganar experiencia en la fabricación y prueba del producto TIL antes de la fabricación con GMP del producto TIL autólogo para su administración a pacientes. El procedimiento de fabricación utilizado para las ejecuciones de ingeniería fue a la misma escala que el que se utilizará en la fabricación del producto TIL con GMP. La experiencia en el cultivo de TIL de diversos tipos de tumores, incluidas metástasis de melanoma, carcinoma de células escamosas de mama, cabeza y cuello (HNSCC), carcinoma de cuello uterino y cáncer de pulmón ha determinado que la disección y el crecimiento de TIL de muestras de tumores metastásicos es similar para estos cánceres. (Sethuraman 2016, JITC P42). Debido a que el aislamiento inicial de fragmentos tumorales y
- 20 el crecimiento de linfocitos parece ser similar entre las histologías tumorales, estas ejecuciones de ingeniería son suficientes para calificar el procedimiento para la producción de TIL a partir de HNSCC, tumores cervicales y melanoma.

La Tabla 10 muestra la fuente y las características de las muestras tumorales utilizadas para las ejecuciones de ingeniería.

25 TABLA 10. Muestras de tumores analizadas para ejecuciones de ingeniería.

Muestra de tumor	Ejecución de ingeniería 1	Ejecución de ingeniería 2	Ejecución de ingeniería 3
ID de paciente	1001185	600-D455	40231
Fuente	Biotheme Research	BioOptions	Moffitt
Tejido	Pulmón, izquierdo	Mama, ERPR+Her2-	Melanoma
Fecha tratada	5 de enero, 2017	12 de enero, 2017	26 de enero, 2017

- 30 Se completaron las pruebas de liberación de las tres ejecuciones de ingeniería de TIL en la instalación de desarrollo de procedimientos (Tabla 11) como se describe más adelante. El producto se probó el día 16 y el día 22. También se determinó la secreción de IFN- γ para las tres ejecuciones de ingeniería (Tabla 12) como se detalla en otra parte.

TABLA 11. Resultados de las pruebas de liberación de productos para ejecuciones de ingeniería en la instalación de desarrollo de procedimientos.

	Parámetro	Procedimiento de prueba	Criterios de aceptación	Ejecuciones de ingeniería		
				Ejecución 1	Ejecución 2	Ejecución 3
Día 16	Esterilidad*	BacTAlert	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
	Micoplasma	PCR	Negativo desde	Negativo	Negativo	Negativo

	Parámetro	Procedimiento de prueba	Criterios de aceptación	Ejecuciones de ingeniería		
				Ejecución 1	Ejecución 2	Ejecución 3
			división de día 7			
Día 22	Viabilidad (%)	AOPI	≥ 70%	82.3%	85.13%	84.6%
	Células viables totales	AOPI	Resultados de informe	2.6 x 10 ¹⁰	1 x 10 ¹⁰	1.4 X 10 ¹¹
	Esterilidad	Tinción de Gram	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Esterilidad Producto final*	BacT/Alert	Sin crecimiento	Negativo	Negativo	Pendiente
	% CD45+CD3+	Citometría de flujo	≥ 90%	99.3%	96.3%	99.8%
	Endotoxina	EndoSafe	≤ 0.7 EU/mL	<0.5 EU/mL	<0.5 EU/mL	<0.5 EU/mL
	Micoplasma Producto final	PCR	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Apariencia	Inspección visual	Bolsa intacta sin terrones visibles	Bolsa intacta, sin terrones visibles	Bolsa intacta, sin terrones visibles	Bolsa intacta, sin terrones visibles
* Resultados de esterilidad finales para el Día 16 y Día 22 no se encuentran disponibles hasta después de liberación final de producto para envío. Los resultados de tinción de Gram del Día 22 se usan para liberación de envío de esterilidad						

TABLA 12. Caracterización funcional adicional: medición de la secreción de IFN-γ.

Caracterización funcional	Procedimiento	Resultados esperados	Ejecución de ingeniería		
			Ejecución 1	Ejecución 2	Ejecución 3
Estimulación de IFN-γ con anti-CD3, CD28, CD137 (pg/millón de células)	ELISA	>2 desviaciones estándar sobre no estimuladas	3085 +/-182	2363 +/-437	pendiente
IFN-γ No-estimuladas (pg/millón de células)	ELISA	No aplicable	34 +/-5	27 +/-10	pendiente

5 En conclusión, los datos de las ejecuciones de ingeniería demuestran que el producto farmacéutico de TIL puede fabricarse con el propósito de la administración autóloga a pacientes.

EJEMPLO 4: LINFODEPLECIÓN

Los recuentos de células se pueden tomar el día 7 y antes de la linfodepleción. El producto celular final incluía hasta alrededor de 150×10^9 células viables formuladas en un mínimo de 50% de HypoThermosol™ en Plasma-Lyte A™ (volumen/volumen) y hasta un 0.5% de HSA (compatible para infusión humana) que contenía 300 UI/ml de IL2. El producto final estaba disponible para la administración en uno de dos volúmenes para infusión:

- 5 1) 250 ml (en una bolsa de infusión de 300 ml de capacidad) cuando el total de TIL recolectado es $\leq 75 \times 10^9$

o

- 2) 500 ml (en una bolsa de infusión de 600 ml de capacidad) cuando el total de TIL recolectado es $< 150 \times 10^9$

- 10 No se puede predecir el número total de células que podrían generarse para el producto de infusión de TIL final para cada paciente debido a la variación de paciente a paciente en las tasas de expansión de células T durante la etapa de REP. Se establece un límite inferior de células en los días 3, 4, 5, 6, 7 del REP de 3 a 14 días en función del número mínimo de células necesarias para tomar la decisión de practicar una linfodepleción en el paciente usando el régimen de quimioterapia con ciclofosfamida más fludarabina. Una vez que hemos comenzado la linfodepleción en función de este número mínimo de células alcanzado, nos comprometemos a tratar al paciente con el número disponible de TIL que generamos en el REP en cualquiera de los días 3 a 14, y en muchos casos el día 7. El límite superior del intervalo para la infusión (150×10^9 células viables) se basa en el límite superior conocido, publicado, infundido de forma segura cuando se ha alcanzado una respuesta clínica. Radvanyi, et al., Clin Cancer Res 2012, 18, 6758-6770.

EJEMPLO 5: PROCEDIMIENTO 2A - DÍA 0

Este ejemplo describe el protocolo detallado del día 0 para el procedimiento 2A descrito en los Ejemplos 1 a 4.

20 Preparación.

1. El medio de lavado de tumores confirmado, CM1 e IL-2 están dentro de la fecha de vencimiento.
2. Se colocó CM1 (medio celular 1) en la incubadora.

Procedimiento.

1. Se limpió la cabina de seguridad biológica (BSC).
- 25 2. Se colocaron placas de vigilancia en desarrollo y se dejaron en la cabina de bioseguridad durante 1-2 horas durante el procedimiento.
3. Se colocó el medio TIL CM en la cabina de seguridad biológica.
4. Se preparó el medio de TIL CM1 que contiene 6000 UI/ml de IL-2:
 - 4.1. 1L CM1
 - 30 4.2. 1 ml de IL-2 (6,000,000 UI/ml)
 - 4.3. Se colocaron 25 ml de CM1 + IL2 en cono de 50 ml para usarlos en los fragmentos al agregarlos a G-REX.
 - 4.4. Se colocaron en una incubadora a 37°C para precalentar
 5. Se limpió el paquete G-REX 100MCS con alcohol al 70% y se colocó en una cabina de bioseguridad. Se cerraron todas las abrazaderas excepto la línea de filtro.
 - 35 6. Se realizó la calibración de la bomba Acacia.
 7. Se conectó la línea roja del matraz G-REX 100MCS a la línea de salida de la campana de la bomba de acacia.
 8. Se colocó el pumpmatic en la línea de entrada de la campana de la bomba y lo colocó en la botella con el medio. Se liberaon las abrazaderas para la campana de la bomba.
 - 40 9. Se bombearon los 975 ml restantes de CM1 precalentado que contenían 6,000 UI/ml de IL-2 en cada biorreactor G-REX 100MCS.
 10. Se calentó la línea roja del sello, se desconectó de la campana de la bomba.
 11. Se colocó la etiqueta en G-REX.
 12. Se colocó G-REX 100MCS en la incubadora hasta que sea necesario.

Disección de tejido

1. Se registró la hora de inicio del tratamiento del tumor.
2. Se transfirió medio de lavado tumoral a BSC.
3. Se colocaron 5 placas de Petri de 100 mm en la cabina de bioseguridad, 3 para lavados, 1 para retención y 1 para tejido desfavorable. Las placas se etiquetaron de manera correspondiente. El tejido desfavorable se indicó por tejido adiposo amarillo o tejido necrótico.
4. Se colocaron las tres placas de 6 pocillos en una cabina de bioseguridad.
5. Se pipetearon 3-5 ml de medio de lavado tumoral en cada pocillo de una placa de seis pocillos para detectar el exceso de piezas tumorales.
6. Se pipetearon 50 ml de medio de lavado tumoral para lavar las placas 1-3 y la placa de retención.
7. Se colocaron dos placas de disección de 150 mm en una cabina de bioseguridad.
8. Se colocaron 3 tubos cónicos estériles de 50 ml en la BSC.
9. Se etiquetó uno como medio de lavado de tumores con pinzas, el segundo como medio de lavado de tumores de bisturí y el tercero como medio de lavado de tumores usado para gotas de tapa.
10. Se agregaron de 5 a 20 ml de medio de lavado de tumores a cada cono. Las pinzas y los bisturís se sumergieron en el medio de lavado del tumor según fue necesario durante el lavado y procedimiento de disección del tumor.
11. Se colocaron el bisturí y las pinzas en tubos apropiados.
12. Con unas pinzas largas, se extrajeron los tumores del matraz de muestras y se transfirieron a la placa de Lavado 1.
13. Se incubó el tumor a temperatura ambiente en la placa de Lavado 1 durante ≥ 3 minutos.
14. Durante la incubación, se volvió a etiquetar el matraz de muestras como "Carga biológica" y se le almacenó a 2-8°C hasta la recolección final o se requieran más pruebas de esterilidad.
15. Utilizando unas pinzas, se transfirió el tumor a la placa de lavado 2.
16. Se incubó el tumor al ambiente en la placa de lavado 2 durante ≥ 3 minutos.
17. Durante la incubación, usando una pipeta de transferencia, se agregaron alrededor de 4 gotas individuales espaciadas uniformemente de medio de lavado tumoral a cada círculo de las tapas de las placas de 6 pocillos designadas como placas de fragmentos tumorales.
18. Utilizando unas pinzas, se transfirió el tumor a la placa de lavado 3.
19. Se incubó el tumor al ambiente en la placa de lavado 3 durante ≥ 3 minutos.
20. La tapa de la placa de 150 mm se utilizó para la disección. Se colocó una regla debajo.
21. Con unas pinzas se transfirió el tumor a la placa de disección, se midió y se registró la longitud del tumor.
22. Se tomó una fotografía del tumor.
23. Se realizó una disección inicial de las piezas tumorales en la placa de Disección en piezas intermedias cuidando de conservar la estructura tumoral de cada pieza intermedia.
24. Se transfirieron las piezas de tumor intermedias que no se diseccionaban activamente en fragmentos a la placa de retención de tejido para garantizar que el tejido permaneciera hidratado durante todo el procedimiento de disección.
25. Se trabajó con una pieza de tumor intermedia a la vez, se cortó cuidadosamente el tumor en fragmentos de alrededor de 3×3×3 mm en la placa de disección, usando la regla debajo de la placa como referencia.
26. Se continuó diseccionando fragmentos de la pieza de tumor intermedia hasta que se evaluó todo el tejido de la pieza intermedia.
27. Se seleccionaron fragmentos favorables y usando una pipeta de transferencia se transfirieron hasta 4 fragmentos favorables en las gotas del medio de lavado en un círculo en la placa de Fragmentos tumorales.

Con una pipeta de transferencia, bisturí o pinzas, se transfirió la mayor cantidad posible del tejido desfavorable y el producto de desecho a la placa de tejido desfavorable para limpiar la placa de disección. Todo el tejido restante se colocó en uno de los pocillos de la placa de seis pocillos. (El tejido desfavorable se indicó por tejido adiposo amarillo o tejido necrótico).

- 5 28. Se continuó el tratamiento repitiendo las etapas 23-26 para las piezas intermedias restantes del tumor, trabajando una pieza intermedia a la vez hasta que se hubo tratado todo el tumor. (Se obtuvieron un bisturí nuevo o unas pinzas según era necesario, por decisión del técnico de tratamiento).
29. Las placas de fragmentos se movieron hacia la parte trasera del extractor.
- 10 30. Con una pipeta de transferencia, el bisturí o las pinzas, se transfirieron hasta 50 de los mejores fragmentos tumorales a los fragmentos tumorales etiquetados con tubo cónico de 50 ml que contenían el CM1.
31. Se retiraron los flotadores del cono de 50 ml con una pipeta de transferencia. Se registró el número de fragmentos y flotadores.
32. Se retiraron todos los elementos innecesarios del extractor, conservando las placas de tejido favorables si contenían fragmentos adicionales. El extractor se limpió con una toallita con alcohol.
- 15 33. Se sacó el G-REX 100MCS de la incubadora, se limpió con alcohol al 70% y se colocó en una cabina de bioseguridad.
34. La forma cónica se agitó con fragmentos de tumor y se vertió el contenido del cono de 50 ml en el matraz G-Rex 100MCS
- 20 35. Si uno o más fragmentos tumorales se transfirieron al matraz G-Rex 100M flotador, se obtuvo un fragmento tumoral adicional cuando estuvo disponible en la placa de tejido favorable y se transfirió al matraz G-Rex 100M.
36. Se registraron # (s) de incubadora y número total de fragmentos añadidos a cada matraz.
37. Se colocó el biorreactor G-REX 100M en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C
38. Cualquier tumor no utilizado se colocó en 100 mL de HypoThermosol y se envió al laboratorio.
39. Se registró el tiempo de parada del tratamiento del tumor.
- 25 40. Se desechó cualquier medio completo TIL no utilizado que contenía IL-2 y cualquier alícuota no utilizada de IL-2.
41. La cabina de seguridad biológica se limpió.
42. Se colocó la muestra de Bioburden (biocarga) en las condiciones adecuadas de almacenamiento.
43. Se registraron los datos.
- 30 44. Se guardó la imagen como número de identificación de la muestra de archivo, fecha del procedimiento del tumor en el archivo preparado del paciente.
45. Se ordenó y se aseguró la entrega de placas de sedimentación al laboratorio de microbiología.

EJEMPLO 6: PROCEDIMIENTO 2A - DÍA 11

- 35 Este ejemplo describe el protocolo detallado del día 11 para el procedimiento 2A descrito en los Ejemplos 1 a 4.

Preparación previa.

1. Día antes del tratamiento:

1.1. CM2 podría prepararse el día antes de que ocurriera el tratamiento. Colocar a 4°C.

2. Día de tramitación.

- 40 2.1. Se preparó el arnés de la célula de alimentación.

2.1.1. Se cerraron todas las abrazaderas en un juego de conectores CC2 y 4S-4M60.

2.1.2. Se soldaron 4 espigas estériles del arnés 4S-4M60 a la línea de espigas en el CC2 quitando la espiga.

2.1.3. Se reservó para la agrupación de células de alimentación.

2.2. Se prepararon 5 mL de medio de crioconservación según CTF-FORM-318 y se colocaron a 4°C hasta necesitarse.

Monitoreo ambiental de sala limpia – Pretratamiento

1. Se registro la Información de la sala limpia.
- 5 2. Las cabinas de bioseguridad (BSC) se limpiaron con toallitas grandes con alcohol saturado o aerosol con alcohol.
3. Recuentos de partículas verificados durante 10 minutos antes de comenzar el tratamiento.
4. Se colocaron las placas de vigilancia en desarrollo y se dejaron en la cabina de bioseguridad durante 1-2 horas durante el procedimiento.
- 10 Preparar el matraz G-Rex 500MCS:
 1. Con una jeringa de 10 ml, se transfirió asépticamente 0.5 ml de IL-2 (solución madre es 6×10^6 UI/ml) por cada litro de CM2 (medio celular 2) a la bolsa de bioprocedimiento a través de un conector luer hembra estéril sin usar.
 - 15 2. Se usó el exceso de aire en la jeringa para despejar la línea, se extrajo un poco de medio de la bolsa y se expulsó hacia atrás. Esto aseguró que toda la IL-2 se hubiera mezclado con el medio. Se mezcló bien.
 3. Se abrió el embalaje exterior y se colocó el G-Rex 500MCS en la BSC. Se cerraron todas las abrazaderas sobre el dispositivo, excepto la línea de filtro grande.
 4. Se unió de modo estéril la línea de recolección roja del G-Rex 500MCS a la línea de salida de la tubería de la bomba.
 - 20 5. Se conectó el luer hembra de la bolsa de bioprocedimientos al luer macho de la campana de la bomba.
 6. Se colgó la bolsa de bioprocedimientos en el portasueros IV, se abrieron las abrazaderas y se bombearon 4.5 litros del medio CM2 en el G-Rex 500MCS. Se despejaron la línea, la abrazadera y el sello térmico.
 7. Se retuvo la línea de la bomba al medio. Se utilizó para preparar células alimentadoras.
 8. Se colocó G-Rex 500MCS en la incubadora.
 - 25 Preparar las células de alimentación irradiadas
 1. Se selló (sellaron) las espiga (s) de TP de IL. Se sujetaron ambas líneas.
 2. Se registró el peso seco de un paquete de transferencia (TP) de 1L.
 3. Se unió estérilmente el paquete de transferencia de 1L a la campana de la bomba de acacia -12" desde la bolsa.
 - 30 4. El otro extremo del tubo de la bomba todavía estaba conectado al recipiente para laboratorio de 10 litros.
 5. Se bombearon 500 ml de CM2 por peso al TP.
 6. Se cerró la abrazadera y se selló cerca de la junta unida.
 7. Se colocó en la incubadora.
 8. Se verificaron y se desconectaron las bolsas de células de alimentación.
 - 35 9. Se registró el lote de alimentador usado.
 10. Las bolsas se limpiaron con alcohol.
 11. Se colocaron en bolsas con cierre hermético.
 12. Células de alimentación se descongelaron en el baño de agua a 37°C (+/-1°C). Se registró la temperatura del baño de agua.
 - 40 13. Se retiraron y se secaron con gasa.
 14. Las células de alimentación se pasaron a través de la sala de preparación.

15. Se transfirieron a BSC en sala limpia.
16. Usando el arnés del alimentador preparado previamente, se unió el 1L TP con medio a una de las líneas no utilizadas en el lado del puerto de muestra de la llave de paso de 3 vías lo más cerca posible de la unión del sello, perdiendo la menor cantidad de tubería posible.
- 5 17. Se colocó el arnés del alimentador en la BSC.
18. Se agarró cada una de las 3 bolsas de alimentación con la espiga del arnés del alimentador en el puerto único de la bolsa de alimentación.
19. Se giró la válvula de la llave de paso para que el 1L TP estuviera en la posición "APAGADO" ("OFF").
- 10 20. Trabajando con una bolsa a la vez, se abrieron las pinzas en la línea a la bolsa de alimentación, se expulsó el aire en la jeringa y se extrajo el contenido de la bolsa de alimentación a la jeringa. El aire expulsado de la jeringa ayudó a recuperar las células. Abrazadera cerrada a la bolsa de alimentación.
21. Se registró el volumen recuperado de células de alimentación descongeladas en cada bolsa.
22. Se giró la válvula de la llave de paso para que la bolsa de alimentación esté en la posición "APAGADO".
23. Se abrió la pinza del TP y se despachó el contenido de la jeringa al TP.
- 15 24. Se aseguró de que la línea se haya despejado y se volvió a sujetar el TP. Es posible que se haya tenido que sacar un poco de aire a la jeringa desde el TP para despejar la línea.
25. Se mezclaron bien las células.
26. Se cerró la abrazadera a la bolsa de alimentación.
27. Se giró la llave de paso para que el puerto de la jeringa esté en la posición "APAGADO". Se desconectó la jeringa de 60 ml de la llave de paso.
- 20 28. Se reemplazó con una nueva jeringa para cada bolsa de alimentación.
29. La jeringa se dejó puesta después de la última bolsa.
30. Se mezcló bien la formulación final del alimentador.
- 25 31. Se giró la llave de paso para que la suspensión de la célula de alimentación estuviera en la posición "APAGADO".
32. Se mezclaron las células y utilizando una jeringa de 5 ml y un puerto sin agujas, se enjuagó el puerto con un poco de solución de células para garantizar un muestreo preciso y se extrajo 1 ml de células, se colocó en un tubo etiquetado para el recuento.
- 30 33. Se repitió con la segunda jeringa. Cada una de estas dos muestras independientes tuvo un recuento de células individuales.
34. Se giró la llave de paso para que la suspensión del alimentador estuviera en la posición "ABIERTA" y se usó la jeringa de 60 ml unida al aire expulsado del arnés hacia el TP para despejar la línea.
35. Se quitó la jeringa y se cubrió el puerto luer con una nueva tapa estéril.
36. Se selló con calor el TP cerca de la junta soldada, se retiró el arnés.
- 35 37. Se registró la masa del paquete de transferencia con la suspensión celular y se calculó el volumen de la suspensión celular.
38. Se colocó en incubadora.
39. Se realizó un recuento de una sola célula en la muestra de la célula de alimentación y se registraron los datos y se adjuntaron los datos primarios de recuento al registro de lote.
- 40 40. Se documentó el programa de recuento de Cellometer.
41. Se verificó que hubiera ingresado la dilución correcta en el Cellometer.
42. Se calculó la densidad celular viable total en el paquete de transferencia del alimentador.

43. Si el recuento de células era $< 5 \times 10^9$, se descongelaron más células, se contaron y se agregaron a las células de alimentación.
 44. Se pesó nuevamente la bolsa de alimentación y se calculó el volumen.
 45. Se calculó el volumen de células para eliminar.
- 5 Adición de alimentador a G-REX
1. Se unió estérilmente un juego de transferencia de 4" al TP del alimentador.
 2. En la BSC se adjuntó una jeringa de tamaño apropiado al luer hembra unido al paquete de transferencia del alimentador.
 3. Se mezclaron bien las células y se eliminó el volumen calculado en la etapa 40 o 41 para conseguir 5.0×10^9 células. Se desecharon las células innecesarias.
 4. Con una jeringa de 1 ml y una aguja de 18 G, se extrajeron 0.150 ml de OKT3, se retiró la aguja y se transfirió al TP del alimentador a través del luer hembra.
 5. Se enjuagaron bien el tubo y la jeringa con la célula de alimentación y la bolsa mixta. Se limpió la línea con aire de la jeringa.
 6. Se retiró el G-Rex 500MCS de la incubadora, se limpió con toallitas con alcohol y se colocó al lado del SCD.
 7. Se unió estérilmente la bolsa de alimentación a la línea roja del G-Rex 500MCS. Se soltó la línea y se permitió que las células de alimentación fluyeran al matraz por gravedad.
 8. Se aseguró de que la línea se hubiera limpiado por completo, luego se selló con calor la línea cerca de la soldadura original y se retiró la bolsa de alimentación.
 9. Se devolvió el G-Rex 500MCS a la incubadora y se registró el tiempo.
- Preparar TIL: registro del tiempo de inicio de la recolección de TIL
1. Se retiró con cuidado el G-Rex 100MCS de la incubadora y se cerraron todas las abrazaderas excepto la línea de filtro grande.
 2. Se unió un paquete de transferencia de 1L a la línea roja en el G-REX 100MCS.
 3. Se cerró la abrazadera en un TP de 300ml. Se selló con calor a -12 pulgadas de la bolsa quitando la espiga. Se registró peso/masa seca.
 4. Se unió estérilmente el paquete de transferencia de 300 ml a la línea de recolección de células en el 100MCS cerca del sello térmico. La línea se sujetó con abrazadera.
 5. Se soltaron todas las abrazaderas que conducen al TP de 1L.
 6. Con GatheRex se transfirieron ~900 ml del sobrenadante del cultivo al paquete de transferencia de 1 L. Gatherex se detuvo cuando el aire entró en la línea. Se sujetó la línea y el sello térmico.
 7. Se agitó el matraz hasta que todas las células se hubieron desprendido de la membrana. Se verificó la membrana para asegurarse de que todas las células estaban desprendidas.
 8. Se inclinó el matraz alejándolo del tubo de recogida y se dejó que los fragmentos tumorales se depositaran en el borde.
 9. Se inclinó lentamente el matraz hacia el tubo de recolección de modo que los fragmentos quedaran en el lado opuesto del matraz.
 10. Usando GatheRex se transfirió la suspensión de células residuales al paquete transferido de 300 ml evitando fragmentos tumorales.
 11. Se volvió a comprobar que se habían eliminado todas las células de la membrana.
 12. Si era necesario, se lavar de nuevo soltando las abrazaderas de GatheRex y se dejó que un poco de medio fluyera al matraz G-Rex 100MCS por gravedad.
 13. Se golpeó vigorosamente el matraz para liberar las células y se bombeó a 300 ml de TP.
 14. Una vez completada la recolección, se cerró la línea roja y se selló con calor.

15. Se selló con calor la línea de recolección dejando aproximadamente la misma longitud de tubería que cuando se registró el peso seco.
16. Se registró la masa (incluida la masa seca) del TP de 300 ml que contenía la suspensión celular y se calculó el volumen de la suspensión celular.
- 5 17. En la BSC se sujetó el TP de 300 ml con un conjunto de transferencia de plasma de 4". Las células se mezclaron bien. Se adjuntó asépticamente una jeringa de 5 ml, se extrajo 1 ml, se colocó en un vial criogénico. Se repitió con una segunda jeringa. Se utilizaron para el recuento, la viabilidad de las células.
18. Se volvió a sujetar y se reemplazó la tapa luer con una nueva tapa luer estéril.
19. Se colocó en la incubadora y se registró el tiempo y lugar en la incubadora.
- 10 20. Se realizó un solo recuento de células en cada muestra y se registraron los datos y se adjuntaron los datos brutos de recuento al registro del lote.
21. Se documentó el programa de recuento de Cellometer.
22. se verificó que se hubiera ingresado la dilución correcta en el Cellometer.
23. Cuando fue necesario, se ajustó la densidad de TIL viables totales a $\leq 2 \times 10^8$ células viables.
- 15 24. Se calculó el volumen para eliminar o anotar que ajuste innecesario.
25. En la BSC, se conectó asépticamente una jeringa del tamaño adecuado al TP de 300 ml.
26. Si se requirió, se eliminó el volumen calculado de células calculadas en la tabla "Calcular volumen para eliminar".
27. Se sujetó y se selló con calor el TP de 300 ml.
- 20 28. Se transfirió el exceso de células a un tubo cónico de tamaño adecuado y se colocó en la incubadora con la tapa aflojada para su posterior crioconservación.
29. Se sacó el G-Rex 500MCS de la incubadora y se colocó al lado del SCD.
30. Se unió estérilmente el TP de 300 ml a la línea de entrada de la bomba Acacia.
31. Se unió estérilmente la línea roja del G-Rex 500MCS a la línea de salida de la bomba Acacia.
- 25 32. Se bombearon las células a un matraz.
33. Se aseguró de que la línea se haya despejado por completo y luego se selló con calor la línea roja cerca de la soldadura original.
34. Se verificó que todas las abrazaderas del G-Rex 500MCS estuvieran cerradas, excepto la línea de filtro grande.
- 30 35. Se devolvió el G-Rex 500MCS a la incubadora y se registró el tiempo colocado en la incubadora G-Rex.
36. Se ordenó y se aseguró la entrega de placas de sedimentación al laboratorio de microbiología.

Crioconservación del exceso

Cantidad calculada de medio de congelación para agregar a las células:

TABLA 13: La concentración de células diana fue de 1×10^8 /ml

A. Células totales retiradas (de la etapa 15)	mL
B. Concentración de células diana	1×10^8 células/mL
Volumen de medio de congelación para agregar (A/B)	mL

35

37. Se centrifugaron los TIL a $400 \times g$ durante 5 min a 20°C con freno total y aceleración total.
38. Se aspiró asépticamente el sobrenadante.

39. Se golpeó suavemente el fondo del tubo para resuspender las células en el líquido restante.
40. Mientras se golpeaba suavemente el tubo, se agregó lentamente el medio de congelación preparado.
41. Se tomaron alícuotas en tubos criogénicos de tamaño apropiado y se registró el tiempo de colocación de las células a -80°C .

5 EJEMPLO 7: PROCEDIMIENTO 2A - DÍA 16

Este ejemplo describe el protocolo detallado del día 16 para el procedimiento 2A descrito en los Ejemplos 1 a 4.

Monitoreo ambiental de sala limpia - Pretratamiento.

1. Las cabinas de bioseguridad se limpiaron con toallitas grandes con alcohol saturado o spray de alcohol.
- 10 2. Se verificaron recuentos de partículas durante 10 minutos antes de comenzar el tratamiento.
3. Se colocaron las placas de vigilancia en desarrollo y se dejaron en la cabina de bioseguridad durante 1-2 horas durante el procedimiento.
- Recolección y recuento de TIL.
- 15 1. Se calentó una bolsa de 10 L de CM4 para cultivos iniciados con menos de 50×10^6 TIL en una incubadora a 37°C durante al menos 30 minutos o hasta estar listos para usar.
2. En la BSC, se conectó asépticamente un juego de extensión Baxter a una bolsa Labtainer de 10 litros.
3. Se retiró el matraz G-Rex 500MCS de la incubadora y se colocó en la mesa junto al GatheRex. Se verificó que todas las abrazaderas estuvieran cerradas excepto la línea de filtro grande. Se movió la abrazadera de la línea de conexión rápida cerca de la unión en "T".
- 20 4. Se unió estérilmente un Labtainer de 10L a la línea de recolección roja en el G-Rex 500MCS a través del tubo soldable en la extensión Baxter.
5. Se selló con calor un paquete de transferencia de 2L 2" por debajo de la "Y", retirando la espiga y se registró el peso seco. Se unió estérilmente el TP de 2L a la línea de recolección despejada en el G-Rex 500MCS.
6. Se colocó el G-Rex 500MCS en una superficie a nivel.
- 25 7. Se soltaron todas las abrazaderas que conducen al Labtainer de 10L y utilizando GatheRex se transfirió -4L de sobrenadante de cultivo al Labtainer de 10L.
8. Se recolectó de acuerdo con las instrucciones de recolección apropiadas de GatheRex.
9. Se fijó la línea roja y se registró la hora en que se inició la recolección de TIL.
10. GatheRex se detuvo cuando entró aire en la línea. Se sujetó la línea roja.
- 30 11. Después de eliminar el sobrenadante, se agitó el matraz hasta que todas las células se hubieron desprendido de la membrana. Se inclinó el matraz para asegurarse de que la manguera estuviera en el borde del matraz.
12. Se soltaron todas las abrazaderas que conducen al TP de 2L y usando GatheRex se transfirió la suspensión de células residuales al TP de 2L manteniendo el borde inclinado hasta que se hubieron recolectado todas las células.
- 35 13. Se inspeccionó la membrana en busca de células adherentes.
14. Si es necesario, se volvió a lavar soltando las abrazaderas en la línea roja y se dejó que algo de medio fluyera al matraz por gravedad.
15. Se cerró la línea roja y se termoselló de modo triple.
- 40 16. Se golpeó el matraz vigorosamente para liberar células.
17. Se agregaron células a TP de 2L.
18. Se selló con calor el paquete de transferencia de 2 L dejando aproximadamente la misma longitud de tubo que cuando se registró el peso seco.

19. Se retuvo G-Rex 500MCS, se reutilizó en la división.

20. Se registró la masa del paquete de transferencia con la suspensión celular y se calculó el volumen de la suspensión celular.

21. Se determinó el volumen de suspensión celular, incluida la masa seca.

5 22. Se unió estérilmente un juego de transferencia de 4" a la bolsa de suspensión celular.

23. En la BSC se mezclaron las células suavemente y con una jeringa de 20 cc se extrajeron 11 ml y se tomaron alícuotas como se muestra en la Tabla 14:

TABLA 14. Parámetros de prueba.

Prueba	Volumen de muestra	Recipiente
Recuento y viabilidad de células	Muestras de 2-2mL	Criovials
Micoplasma	1 mL	Criovial almacenado a 4 °C hasta completar prueba
Esterilidad	1 mL	Inoculados 0.5mL a cada una de las botellas de cultivo anaeróbico y aeróbico
Flujo	2 -2mL	Recuento de células no usado (Crioconservados para pruebas futuras de lotes)
Resto de células		Descartadas

10 24. Se selló al calor. Se cerró la conexión luer reteniendo la abrazadera

25. Se etiquetó y se colocó la suspensión celular en la incubadora y se registró el tiempo que se colocó en la incubadora.

26. Se calculó nuevo volumen.

15 27. Se registró el volumen en el paquete de transferencia de 2 L basado en el volumen de suspensión celular y el volumen extraído para CC (11 ml).

28. Se inocularon y se ordenaron pruebas de esterilidad.

29. Se guardó la muestra de micoplasma a 4°C en el estante pendiente para la prueba de micoplasma.

30. Se dejó a un lado hasta que se sembró TIL.

Recuento de células:

20 Se realizaron recuentos de células individuales y se registraron datos y se adjuntaron los datos brutos de recuento al registro por lotes. Se documentó la dilución. Se documentó el programa de recuento de Cellometer. Se verificó que la dilución correcta se hubiera ingresado al Cellometer.

Continuación del procedimiento:

25 31. Se calculó el número total de matraces necesarios para el subcultivo **Se reutilizó el recipiente original y se redondearon hacia arriba las fracciones de los recipientes adicionales.

Adición de IL-2 a CM

1. Se colocó una bolsa de 10 litros de Aim V con Glutamax en la BSC.

2. Se agarró la bolsa de medios con un equipo de transferencia de plasma de 4".

30 3. Se conectó una aguja de 18G a una jeringa de 10 ml y se sacaron 5 ml de IL-2 a la jeringa (la concentración final es de 3000 UI/ml).

4. Se quitó la aguja y se conectó asépticamente la jeringa al equipo de transferencia de plasma y se despachó IL-2 a la bolsa.

5. Se purgó la línea con aire, se saco un poco de medio y se despachó a la bolsa. Esto aseguró que toda la IL-2 esté en los medios.

6. Se repitió para las bolsas restantes de Aim V.

Preparar matraces G-REX500MCS

5 1. Se determinó la cantidad de CM4 para agregar a los matraces. Se registró el volumen de células agregadas por matraz y volumen de CM4 500mL-A.

2. Se cerraron todas las abrazaderas excepto la línea de filtro grande.

3. Se unió estérilmente la línea de entrada de la bomba Acacia al equipo de transferencia de plasma de 4" en la bolsa de medios que contiene CM4.

10 4. Se unió estérilmente la línea de salida de la bomba al G-Rex 500MCS a través de la línea de recolección roja.

5. Se bombeó determinada cantidad de CM4 al G-Rex 500MCS usando las líneas del matraz como guía.

6. Se selló con calor la línea roja del G-Rex 500MCS.

15 7. Se repitieron las etapas 4-6 para cada matraz. Se pudieron llenar múltiples matraces al mismo tiempo usando llenado por gravedad o bombas múltiples. Se podría soldar un conector en "Y" a la línea de salida de la bomba y soldar los dos brazos a dos matraces G-Rex 500MCS llenando ambos al mismo tiempo.

8. Se colocaron los matraces a 37°C, CO₂ al 5%.

Sembrar matraces con TIL

1. Se cerraron todas las abrazaderas en G-Rex 500MCS excepto la línea de filtro grande

20 2. Se unió estérilmente la bolsa de producto de célula a la línea de entrada de la bomba Acacia.

3. Se unió estérilmente el otro extremo de la bomba a la línea roja del G-Rex 500MCS.

4. Se colocó la campana de la bomba en la bomba.

5. Se colocó la bolsa de producto celular en la balanza analítica y se registró el tiempo TIL agregado al matraz G-REX.

25 6. Se puso a cero la balanza.

7. Se soltaron las abrazaderas de las líneas y se bombeó el volumen requerido de células en G-Rex 500MCS por peso, suponiendo que 1 g=1 ml.

8. Se colocó la bolsa de célula boca abajo y se bombeó aire para despejar la línea. Se selló en caliente la línea roja de G-Rex 500MCS. Se colocó el matraz en incubadora.

30 9. Se unió estérilmente la línea de salida de la bomba al siguiente G-Rex 500MCS a través de la línea de recolección roja.

10. Se mezclaron bien las células.

11. Se repitió la transferencia celular para todos los matraces.

12. Se colocaron los matraces a 37°C, 5% de CO₂ y se registró el tiempo de TIL añadido a matraz G_REX.

35 13. Se solicitaron pruebas para placas de sedimentación al laboratorio de microbiología.

14. Se registraron números de acceso.

15. Se ordenaron pruebas de esterilidad aeróbica y anaeróbica.

16. Se aseguró la entrega de placas y matraces al laboratorio de microbiología.

Crioconservación de flujo o exceso de células:

40 1. Se calculó la cantidad de medio de congelación necesaria:

- a. La concentración de células diana fue de 1×10^8 /ml; se registró el total de células eliminadas. La concentración de células diana fue de 1×10^8 células/ml. Se calculó el volumen total de medios de congelación para agregar.
2. Se preparó el medio de crioconservación y se colocó a 40°C hasta necesitarse.
- 5 3. Se centrifugó TIL a 400 x g durante 5 min a 20°C con freno y aceleración total.
4. Sobrenadante aspirado asépticamente.
5. Se golpeó suavemente el fondo del tubo para resuspender las células en el líquido restante.
6. Mientras golpea suavemente el tubo, se agregó lentamente el medio de congelación preparado.
7. Se reparten alícuotas en tubos criogénicos etiquetados de tamaño apropiado.
- 10 8. Se colocó el vial en un Mr. Frosty o equivalente y se colocó en un congelador a -80°C.
9. Dentro de las 72 horas se transfirió a un lugar de almacenamiento permanente y se documentaron y registraron la fecha y la hora en que fueron colocadas en un congelador a -80°C.

EJEMPLO 8: PROCEDIMIENTO 2A - DÍA 22

- 15 Este ejemplo describe el protocolo detallado del día 22 para el procedimiento 2A descrito en los Ejemplos 1 a 4.

Documentar los resultados negativos de esterilidad en desarrollo

Antes de comenzar la recolección, se obtuvieron los resultados preliminares de esterilidad del día 16 del laboratorio de microbiología. Se comunicó con el director del laboratorio o su designado para obtener más instrucciones si los resultados fueron positivos.

20 Monitoreo ambiental de sala limpia – Pretratamiento

1. Se verificaron recuentos de partículas durante 10 minutos antes de comenzar el tratamiento.
2. Las cabinas de bioseguridad se limpiaron con toallitas grandes con alcohol saturado o en aerosol con alcohol.
3. Se colocaron las placas de vigilancia en desarrollo y se dejaron en la cabina de bioseguridad durante 1-2 horas durante el procedimiento.

25 Preparación avanzada

1. En BSC, se conectó asépticamente un juego de extensión Baxter a una bolsa de contenedor de laboratorio de 10 L o equivalente. Se etiquetó la bolsa de filtrado LOVO.

2. Se colocaron tres bolsas de 1 litro de PlasmaLyte A en la BSC

3. Se preparó la agrupación y se etiquetaron las bolsas PlasmaLyte A con 1% de HSA:

- 30 3.1. Se cerraron todas las abrazaderas en un juego conector 4S-4M60 y se agarró cada una de las bolsas PlasmaLyte.

- 3.2. Se unió uno de los extremos macho del 4S-4M60 a la línea de entrada de la campana de la bomba Acacia.

- 3.3. Se unió la línea de salida de la campana de la bomba a una bolsa de recogida de 3 litros. Se cerraron todas las abrazaderas en la bolsa de 3L excepto la línea para bombear.

- 35 3.4. Se bombearon 3 litros de Plasmalyte a la bolsa de 3 litros. Si es necesario, se elimina el aire de la bolsa de 3 litros invirtiendo la bomba.

- 3.5. Se cerraron todas las abrazaderas excepto la línea con luer hembra.

- 3.6. Usando dos jeringas de 100 ml y agujas de 16-18G, se cargaron 120 ml de HSA al 25%. Jeringas con tapón rojo.

- 40 3.7. Se conectó una jeringa al luer hembra en la bolsa de 3 litros y se transfirió HSA a la bolsa PlasmaLyte de 3 litros. Mezclar bien.

- 3.8. Se repitió con una segunda jeringa.

3.9. Se mezcló bien.

3.10. Se cerraron todas las abrazaderas.

3.11. Usando una jeringa de 10 ml, se quitaron 5 ml de PlasmaLyte con HSA al 1% del puerto sin agujas de la bolsa de 3 litros.

5 3.12. La jeringa se tapó y se guardó en BSC para dilución de IL-2.

3.13. Se cerraron todas las abrazaderas.

3.14. Se selló con calor quitando la línea luer hembra de la campana de la bomba.

3.15. Se etiquetó el regulador de pH de lavado LOVO y se fechó. Caducó en 24 horas a temperatura ambiente.

Preparación de IL-2

10 1. Se despachó Plasmalyte/1% de HSA desde una jeringa de 5 ml en un tubo cónico estéril de 50 ml etiquetado.

2. Se agregaron 0.05 ml de solución madre de IL-2 al tubo que contenía PlasmaLyte.

3. Se etiquetó IL-2 6×10^4

4. Se tapó con la etiqueta y se almacenó a 2-8°C. Se registraron los volúmenes.

Preparación de células

15 1. Se cerraron todas las abrazaderas en una bolsa Labtainerbag de 10 litros. Se conectó el juego de extensión Baxter a la bolsa de 10 litros mediante una conexión luer.

2. Se retiraron los matraces G-REX 500M de la temperatura de 37°C.

3. Se unió en condiciones estériles la línea roja de eliminación de medios del G-Rex 500MCS al juego de extensión en la bolsa de bioprocedimiento de 10L.

20 4. Se unió en condiciones estériles la línea de eliminación de células despejada del G-Rex 500MCS a una bolsa de recolección de 3 litros y se etiquetó como "suspensión de células agrupadas".

5. Se quitó la abrazadera de la línea roja y bolsa de 10L.

6. Se utilizó la bomba GatherRex, se redujo el volumen de primer matraz.

25 Nota: Si se detecta una burbuja de aire, la bomba podría detenerse prematuramente. Si la reducción de volumen total no fue completa, se reactivó la bomba GatherRex.

7. Se cerró la abrazadera de la bolsa de sobrenadante y la línea roja.

8. Se agitó el matraz G-REX 500M hasta que los TIL se resuspendieran por completo evitando salpicaduras o espuma. Se aseguró de que todas las células se hayan desprendido de la membrana.

9. Se abrieron las abrazaderas en la línea despejada y bolsa de célula de 3L.

30 10. Se inclinó el matraz G-Rex de manera que la suspensión celular se agrupara en el costado del matraz donde estaba ubicada la extracción de recolección.

11. Se inició GatherRex para recolectar la suspensión celular. Nota: Si la extracción de recolección de células no estaba en la unión de la pared y la membrana del fondo, golpear el matraz mientras estaba inclinado en un ángulo de 45 ° generalmente era suficiente para posicionar correctamente la extracción.

35 12. Se aseguró de que se hubieran sacado todas las células del matraz.

13. Si quedaron células en el matraz, se agregaron 100 ml de sobrenadante nuevamente al matraz, se agitó y se recogió en la bolsa de suspensión celular.

14. Se cerró la abrazadera en la línea a la bolsa de recolección de células. Se liberaron Alas abrazaderas en GatherRex.

40 15. Se selló en caliente la línea despejada de G-Rex 500MCS.

16. Se selló en caliente la línea roja de G-Rex 500MCS.

17. Se repitieron las etapas 3-16 para matraces adicionales.
18. Fue necesario reemplazar la bolsa de sobrenadante de 10 l según fuera necesario después de cada 2º matraz.
19. Se pueden utilizar múltiples GatherRex.
- 5 20. Se documentó el número de G-Rex 500MCS tratados.
21. Se selló a calor la bolsa recolectora de célula. Se registró el número de G-REX recolectados.
22. Con un marcador, se hizo una marca de ~2" desde uno de los conectores luer hembra de una nueva bolsa de recolección de 3 litros.
23. Se selló con calor y se quitó el luer hembra justo debajo de la marca.
- 10 24. Se etiquetó como bolsa de fuente LOVO
25. Se registró el peso seco.
26. Se cerraron todas las abrazaderas del filtro de sangre de 170 µm.
27. Se unió estérilmente el extremo terminal del filtro a la bolsa de la fuente LOVO justo debajo de la marca.
28. Se unió estérilmente una línea fuente del filtro a la bolsa que contiene la suspensión celular.
- 15 29. Se elevó la suspensión celular colgando las células en un portasueros IV para iniciar la transferencia de células por flujo de gravedad. (Nota: No se permitió que la bolsa de la fuente colgara del aparato de filtración).
30. Se abrieron todas las abrazaderas necesarias y se permitió que TIL drenaran de la bolsa de suspensión celular a través del filtro y dentro de la bolsa de fuente LOVO.
- 20 31. Una vez que se transfirieron todas las células a la bolsa de la fuente LOVO, se cerraron todas las abrazaderas, se selló con calor justo por encima de la marca y se desconectó para quitar el filtro.
32. Se mezcló bien la bolsa y usando dos jeringas de 3 ml se tomaron 2 muestras independientes de 2 ml del puerto de muestra de la jeringa para el recuento y la viabilidad de las células.
33. Se pesó la bolsa y se determinó la diferencia entre el peso inicial y final.
34. Se registraron los datos y lugar en incubadora, incluida la masa seca.
- 25 Recuento de células.
- Se realizó un recuento individual de células en cada muestra y se registraron los datos y se adjuntaron los datos brutos de recuento al registro del lote. Se documentó el programa de recuento de Cellometer. Se verificó que la dilución correcta hubiera ingresado en el Cellometer. Se determinó el número total de células nucleadas. Se determinó el número de TNC a eliminar para retener = 1.5×10^{11} células para el tratamiento de LOVO. Se colocó la célula extraída en un recipiente de tamaño adecuado para su eliminación.
- 30 Recolección de LOVO
- El Labtainer de 10L con juego de extensión Baxter en Preparación previa fue la bolsa de filtrado de repuesto soldada al kit LOVO más adelante. Se encendió LOVO y se siguieron las pantallas.
- Verificar básculas y el sensor de presión.
- 35 Para acceder al perfil de operación del instrumento:
1. Se tocó el botón de información.
2. Se tocó la pestaña de configuración del instrumento.
3. Se tocó el botón Perfil de funcionamiento del instrumento.
4. Se muestra el perfil de funcionamiento del instrumento.
- 40 Revisar las básculas
1. Se aseguró de que no hubiera nada colgado en ninguna de las básculas y se revisó la lectura de cada báscula.

2. Si alguna de las escalas se leyó fuera de un intervalo de 0 +/- 2 g, se realizó la calibración de la báscula como se describe en el Manual de calibración de la báscula del fabricante.

3. Si todas las básculas estaban en tolerancia sin peso colgando, se procedió a colgar un peso de 1 kg en cada báscula (# 1-4) y se revisó la lectura.

- 5 4. Si alguna de las básculas se leyó fuera de un intervalo de 1000 +/- 10 g cuando colgaba un peso de 1 kg, se realizó la calibración de la báscula como se describe en el Manual del operador de LOVO del fabricante.

Verificar el sensor de presión

1. Se revisó la lectura del sensor de presión en la pantalla Perfil de operación del instrumento.

- 10 2. N/A: Si la lectura del sensor de presión estaba fuera de 0 +/- 10 mmHg, se almacenó un nuevo ajuste de presión atmosférica en el modo de servicio como se describe en el Manual del operador de LOVO del fabricante.

a. Se tocó el botón de verificación en la pantalla Perfil de operación del instrumento.

B. Se tocó el botón de verificación en la pestaña Configuración del instrumento.

3. Si se realizó la calibración de la báscula o se ha almacenado un nuevo ajuste de presión atmosférica, se repitieron las secciones pertinentes.

- 15 Para iniciar el procedimiento, se seleccionó el protocolo "Resolución de TIL G-Rex" del menú desplegable en la pantalla de selección de protocolo y se presionó Iniciar.

1. Apareció la pantalla de configuración del procedimiento.

2. Se tocó el botón Información de soluciones.

- 20 3. Apareció la pantalla Solución 1. Se revisó el tipo de regulador de pH de lavado requerido para la Solución 1. (Debía leerse PlasmaLyte).

4. Se tocó el botón Siguiente para avanzar a la pantalla Solución 2. Se revisó el tipo de regulador de pH de lavado requerido para la Solución 2. (Debía leerse "NINGUNO", lo que indicaba que el protocolo se había configurado para usar solo un tipo de regulador de pH de lavado, que era PlasmaLyte)

- 25 5. Se tocó el botón de verificación en la pantalla de información de la solución 2 para volver a la pantalla de configuración del procedimiento.

6. Se tocó el botón de información del procedimiento.

7. Se mostró la pantalla de información del procedimiento.

8. Se tocó el campo de entrada de ID de usuario. Debía aparecer un teclado. Se ingresaron las iniciales del ejecutante y el verificador. Se tocó el botón para aceptar la entrada.

- 30 9. Se tocó el campo de entrada ID de fuente. Debía aparecer un teclado. Se ingresó el número de lote del producto. Se tocó el botón para aceptar la entrada.

10. Se tocó el campo de entrada ID del procedimiento. Debía aparecer un teclado. Se ingresó a "Recolección de TIL". Se tocó el botón para aceptar la entrada.

- 35 11. Si hubo notas adicionales para registrar, se tocó el campo de entrada Nota de procedimiento. Apareció un teclado. Se ingresó cualquier nota. Se tocó el botón para aceptar la entrada.

NOTA: El campo de entrada Nota de procedimiento es opcional y puede dejarse en blanco.

12. Se tocó el botón de verificación en la pantalla de información del procedimiento para volver a la pantalla de configuración del procedimiento.

- 40 13. Se verificó que apareció una "verificación" en el botón Información del procedimiento. Si no apareció ninguna "marca de verificación", se tocó nuevamente el botón Información del procedimiento y se aseguró de que los campos ID de usuario, ID de fuente e ID de procedimiento tuvieran entradas.

14. Se tocó el botón de configuración de parámetros.

15. Apareció la pantalla de información del procedimiento general.

- 45 16. Se tocó el campo de entrada Volumen de la fuente (mL). Apareció un teclado numérico. Se ingresó el volumen calculado de suspensión celular (mL) de la Tabla 1

17. Se tocó el botón para aceptar la entrada.

18. Se tocó el campo de entrada Origen PCV (%). Apareció la pantalla TIL (viable + muerto).

19. Se tocó el campo de entrada Cell Concentration. Apareció un teclado numérico. Se ingresó la concentración celular total/ml de la Tabla 14 en el producto fuente en unidades de " $\times 10^6/\text{ml}$ ". La entrada puede oscilar entre 00.0 y 99.9. Se tocó el botón para aceptar la entrada y regresar a la pantalla de información del procedimiento general. NOTA: Después de que se aceptó la concentración de células, el campo de entrada de PCV de origen (%) en la pantalla de información del procedimiento general mostró el % de PCV calculado por el LOVO, basado en la entrada de concentración de células realizada por el operador.

20. En la pantalla Procedimiento general, se tocó el botón Siguiente para avanzar a la pantalla 4 de 8, la pantalla Volumen del producto final (Volumen retenido). Nota: Las pantallas 2 y 3 no tenían ningún campo de entrada para que el operador los completara.

21. Apareció la pantalla Volumen de producto final (volumen de retención).

22. Utilizando el valor de células nucleadas totales (TNC) de la Tabla 15, se determinó el volumen objetivo del producto final en la siguiente tabla (Tabla 16). Se ingresó el volumen de producto final (ml) asociado con ese intervalo de células durante la configuración del procedimiento LOVO.

TABLA 15. Determinación del volumen objetivo del producto final.

Intervalo de células	Volumen de producto final (retenido) a la diana (mL)
$0 < \text{Total de células (viables + muertas)} \leq 7.1\text{E}10$	150
$7.1\text{E}10 < \text{Total de células (viables + muertas)} \leq 1.1\text{E}11$	200
$1.1\text{E}11 < \text{Total de células (viables + muertas)} \leq 1.5\text{E}11$	250

TABLA 16. Volumen objetivo del producto.

Totalidad de células nucleadas (TNC) $\times 10^6$	Volumen objetivo de producto final (retenido) (mL)

23. Para dirigirse al volumen especificado de la Tabla 16, se tocó el campo de entrada Volumen de producto final (mL). Apareció un teclado numérico. Se ingresó el Volumen de producto final deseado en unidades de mL. Se tocó el botón para aceptar la entrada.

24. Se tocó la pantalla Volumen del producto final (Volumen retenido) para volver a la pantalla Configuración del procedimiento. Nota: Las pantallas 5-8 no tenían ningún campo de entrada para que el operador los completara.

25. Se verificó que apareciera una "Verificación" en el botón Configuración de parámetros. Si no apareció ninguna "verificación", se tocó el botón Información del procedimiento nuevamente y se aseguró de que el Volumen de la fuente y el PCV de la fuente en la página 1 tuvieran entradas. También se aseguró de que la casilla de verificación Volumen de producto final mínimo objetivo estuviera marcada o que el campo Volumen de producto final (ml) tuviera una entrada en la página 4.

26. Se tocó el botón de estimación en la esquina superior derecha de la pantalla.

27. Se mostró la pantalla Resumen de estimación. Se confirmaron valores suficientes y precisos para regulador de pH de lavado Fuente y PlasmaLyte.

28. Se cargó el kit desechable: se siguieron las instrucciones de la pantalla para cargar el kit seleccionando el botón de ayuda "(?)".

29. Se tomó nota de los volúmenes mostrados para el filtrado y la solución 1 (léase PlasmaLyte)

30. Se tomó nota de los volúmenes mostrados para el filtrado y la solución 1 (léase PlasmaLyte).

31. Para obtener instrucciones sobre cómo cargar el kit desechable, se tocó el botón de ayuda o se siguieron las instrucciones del manual del operador para obtener instrucciones detalladas.
32. Cuando se hubo cargado el kit desechable estándar de LOVO, se tocó el botón Siguiente. Apareció la pantalla de información y ubicación del contenedor. Se quitó la bolsa de filtrado de la escala # 3.
- 5 33. Para este protocolo, el contenedor de filtrado era nuevo y fuera de báscula
34. Si el contenedor de filtrado ya se mostraba como Nuevo y Fuera de báscula, no se realizaron cambios.
35. Si el tipo de contenedor de filtrado se mostró como Original, se tocó el botón Original para cambiar a Nuevo.
36. Si la ubicación del filtrado se mostró como Sobre báscula, se tocó el botón Sobre báscula para cambiar a Fuera de báscula.
- 10 37. Si el volumen de filtrado a generar era ≤ 2500 ml, la ubicación del recipiente de filtrado se mostró como Sobre báscula Para lograr coherencia entre las ejecuciones, la ubicación del recipiente de filtrado se cambió a Fuera de báscula y el tipo de recipiente era "nuevo".
38. Se tocó el botón En-escala para cambiar a fuera de báscula. Se conectó el equipo de transferencia adjunto. Se usó una técnica de soldadura estéril para reemplazar el recipiente de filtrado del equipo desechable LOVO por una bolsa de 10 litros. Se abrió la soldadura.
- 15 39. Se colocó el recipiente de filtrado en la mesa. NO se colgó la bolsa de filtrado en la báscula # 3. La báscula No. 3 estuvo vacía durante el procedimiento.
40. Se abrieron las abrazaderas de plástico de la tubería que conduce al recipiente de filtrado. NOTA: Si se quitó el tubo de la abrazadera F durante la soldadura, se volvió a colocarlo en la abrazadera.
- 20 41. Se tocó el campo de entrada Capacidad del contenedor de filtrado. Apareció un teclado numérico. Se ingresó la nueva capacidad total de filtrado (10,000 mL). Se tocó el botón "verificar" para aceptar la entrada.
42. Se utilizó una técnica de soldadura estéril para reemplazar el recipiente de filtrado del kit desechable LOVO por una bolsa de 10 litros. Se abrió la soldadura. Nota: Si se quitó el tubo de la abrazadera F durante la soldadura, volvió a ponerse en la abrazadera.
- 25 43. Se colocó el nuevo recipiente de filtrado en la mesa. NO se colgó la bolsa de filtrado en la báscula # 3. La báscula # 3 estuvo vacía durante el procedimiento.
44. Se abrieron las abrazaderas de plástico de la tubería que conduce al recipiente de filtrado.
45. Para el contenedor de retenido, la pantalla mostraba Original y Sobre báscula.
46. No se realizaron cambios en el contenedor de retenido.
- 30 47. Cuando se realizaron todos los cambios en el contenedor de filtrado y se ingresó la información adecuada, se tocó el botón Siguiente.
48. Apareció la superposición de verificaciones en seco del kit desechable. Se verificó que el kit se habubiera cargado correctamente y luego se tocó el botón Sí.
- 35 49. Todas las abrazaderas mecánicas LOVO se cerraron automáticamente y se mostró la pantalla Comprobación de la instalación del kit desechable. El LOVO pasó por una serie de etapas de presurización para revisar el kit.
50. Después de que la verificación del kit desechable se hubiera aprobado correctamente, se mostró la pantalla Soluciones de conexión.
51. 3 l fue el volumen de lavado. Se ingresó este valor en la pantalla.
- 40 52. Se utilizó una técnica de soldadura estéril para unir la bolsa de 3 L de PlasmaLyte al tubo que pasa por la abrazadera 1. Se abrió la soldadura.
53. Se colgó la bolsa PlasmaLyte en un portasueros,
54. Se abrieron las abrazaderas de plástico del tubo que conduce a la bolsa PlasmaLyte.
55. Se verificó que la entrada de Volumen de solución fuera 3000 ml. Esto fue ingresado previamente.

56. Se tocó el botón Siguiente. Se mostró la superposición del cebado de kit desechable de. Se verificó que PlasmaLyte estuviera conectado y todas las soldaduras y abrazaderas de plástico en la tubería que conduce al PlasmaLyte estuvieran abiertas, luego se tocó el botón Sí. NOTA: Debido a que solo se usó un tipo de regulador de pH de lavado (PlasmaLyte) durante el procedimiento LOVO, no se adjuntó ninguna solución al tubo que pasaba a través de la abrazadera 2. La abrazadera de Roberts en este tubo permaneció cerrada durante el procedimiento.
57. Se inició el cebado del kit desechable y se mostró la pantalla Cebado del kit desechable. Se observó visualmente que PlasmaLyte se movía a través del tubo conectado a la bolsa de PlasmaL Lyte. Si no se movía fluido, se tocó el botón de pausa en la pantalla y determinó si una abrazadera o soldadura todavía estaba cerrada. Una vez que se resolvió el problema, se tocó el botón Reanudar en la pantalla para reanudar el cebado de kit desechable.
58. Cuando el cebado del kit desechable finalizó correctamente, se mostró la pantalla Conectar fuente.
59. Para este protocolo, el contenedor de fuente era nuevo y fuera de báscula
60. Si el contenedor de fuente ya se mostraba como nuevo y fuera de báscula, no se realizaron cambios.
61. Si la ubicación de la Fuente se mostró como Sobre báscula, se tocó el botón Sobre báscula para cambiar a Fuera de báscula.
62. Se tocó el campo de entrada Capacidad de la fuente (ml). Apareció un teclado numérico. Se ingresó la capacidad del contenedor que contenía el producto de fuente. Se tocó el botón de verificación para aceptar la entrada. Nota: La entrada Capacidad de la fuente se utilizó para asegurarse de que la bolsa de la fuente pudiera contener la solución adicional que se agregó a la bolsa durante la fase de cebado de la fuente.
63. Se utilizó una técnica de soldadura estéril para unir el contenedor de la fuente a la tubería que pasa por la abrazadera S. Se abrió la soldadura. Se retiró el tubo de la abrazadera según fuera necesario.
64. Se aseguró de volver a colocar el tubo de la fuente en la abrazadera en S.
65. Se tocó el botón Siguiente. Se mostró la superposición de cebado de fuente. Se verificó que la Fuente estuviera conectada al kit desechable y que las soldaduras y abrazaderas de plástico en el tubo que conduce a la Fuente estuvieran abiertas, luego se tocó el botón Sí.
66. Se inició el cebado de la fuente y se mostró la pantalla de cebado de la fuente. Se observó visualmente que PlasmaLyte se movía a través del tubo conectado a la bolsa de la fuente. Si no se movía fluido, se tocó el botón de pausa en la pantalla y se determinó si una abrazadera o soldadura todavía estaba cerrada. Una vez que se resolvió el problema, se tocó el botón Reanudar en la pantalla para reanudar el Cebado de la fuente.
67. Cuando el cebado de fuente finalizó correctamente, se mostró la pantalla de procedimiento de inicio.
68. Se pulsó el botón Iniciar. Apareció la pantalla de pausa "Ciclo 1 de pre-lavado", con las instrucciones para "Recubrir IP, mezclar fuente".
69. Recubrimiento previo de la bolsa IP.
70. Antes de presionar el botón de inicio, se retiró la bolsa de IP de la báscula de pesaje #2 (también se podría quitar el tubo de la guía de tubo del puerto superior de IP) y se invirtió manualmente para permitir que el regulador de pH de lavado agregado durante la etapa de cebado del kit desechable cubriera todas las superficies interiores de la bolsa.
71. Se volvió a colgar la bolsa de IP en la báscula # 2 (etiqueta en la bolsa hacia la izquierda). Se reemplazó el tubo del puerto superior en la guía del tubo, si se había retirado.
72. Se mezcló la bolsa de fuente.
73. Antes de presionar el botón Inicio, se retiró la bolsa de la fuente de la báscula #1 y se invirtió varias veces para crear una suspensión celular homogénea.
74. Se volvió a colgar la bolsa de la fuente en la báscula #1 o en el portasueros. Se aseguró de que la bolsa no oscilara.
75. Se pulsó el botón Iniciar.
76. El LOVO comenzó a procesar el fluido de la bolsa de la fuente y se mostró la pantalla del ciclo de lavado 1.

Durante el procedimiento LOVO, el sistema se detuvo automáticamente para permitir al operador interactuar con diferentes bolsas. Se mostraron diferentes pantallas durante diferentes pausas. Se siguieron las instrucciones correspondientes para cada pantalla.

Pausa de enjuague de fuente

- 5 Después de drenar la bolsa Fuente, LOVO agregó regulador de pH de lavado a la bolsa Fuente para enjuagar la bolsa. Después de que se hubi agregado el volumen configurado de regulador de pH de lavado a la bolsa de la fuente, el LOVO se pausó automáticamente y se mostró la pantalla Pausa de enjuague de la fuente.

Cuando se mostró la pantalla Pausa de enjuague de fuente, el operador:

1. Quitó la bolsa de la fuente de la báscula # 1.
- 10 1. Invertió la bolsa Fuente varias veces para permitir que el regulador de pH de lavado tocara todo el interior de la bolsa.
2. Volvió a colgar la bolsa de la fuente en la báscula # 1. Se aseguró de que la bolsa de la fuente no oscilara en la báscula n. ° 1.
3. Tocó el botón Reanudar.
- 15 El LOVO procesó el fluido de enjuague de la bolsa Fuente, luego continuó con el procedimiento automatizado.

Pausa de bolsa de mezcla IP

Para preparar las células para otro paso a través del centrifugador, la bolsa de IP se diluyó con regulador de pH de lavado. Después de agregar el regulador de pH de lavado a la bolsa de IP, el LOVO se detuvo automáticamente y mostró la pantalla de pausa "Mezclar bolsa de IP".

- 20 Cuando se mostró la pantalla de pausa "Mezclar bolsa IP", el operador:
1. Quitó la bolsa de IP de la báscula # 2. También podría quitar el tubo de la guía de tubo del puerto superior IP.
 2. Invertió la bolsa de IP varias veces para mezclar bien la suspensión celular.
 3. Volvió a colgar la bolsa de IP en la báscula # 2. También reemplazó el tubo del puerto superior IP en la guía del tubo, si se había retirado. Se aseguró de que la bolsa de IP no oscilara en la báscula # 2.
 - 25 4. Se tocó el botón Reanudar. El LOVO comenzó a procesar el fluido de la bolsa IP.

Pausa de esquinas de IP de masaje

- 30 Durante el ciclo de lavado final del procedimiento LOVO, las células se bombearon desde la bolsa IP, a través del centrifugador, y hacia la bolsa de Retenido (Producto final). Cuando la bolsa de IP estuvo vacía, se agregaron 10 ml de reguladores de pH de lavado al puerto inferior de la bolsa de IP para enjuagar la bolsa. Después de agregar el líquido de enjuague, el LOVO se detuvo automáticamente y mostró la pantalla de pausar "Esquinas de IP de masaje".

Cuando se mostró la pantalla de pausar "Esquinas de IP de masaje", el operador:

1. NO retiró la bolsa de IP de la báscula # 2.
- 35 2. Con la bolsa de IP todavía colgando en la báscula # 2, masajeó las esquinas de la bolsa para poner en suspensión las células residuales.
3. Se aseguró de que la bolsa de IP no oscilara en la báscula # 2.
4. Presionó el botón Reanudar.
5. El LOVO comenzó a bombear el líquido de enjuague de la bolsa IP.
- 40 Al final del procedimiento LOVO, se mostró la pantalla Eliminar productos. Cuando se mostró esta pantalla, se pudieron manipular todas las bolsas del kit LOVO.

Nota: No se tocó ninguna bolsa hasta que apareciera la pantalla Retirar productos.

Se colocó una pinza hemostática en el tubo muy cerca del puerto de la bolsa de Retenido para evitar que la suspensión celular se asentara en el tubo y se selló con triple calor debajo de la pinza hemostática.

Se retiró la bolsa de retenido rompiendo el sello del medio y se transfirió a la BSC.

Se siguieron las instrucciones de la pantalla Retirar productos.

Se tocó el botón Siguiente. Se abrieron todas las abrazaderas mecánicas LOVO y se mostró la pantalla Retirar kit.

- 5 Se siguieron las instrucciones de la pantalla Retirar kit. Cuando terminó, se procedió.

Tocó el botón Siguiente. Se cerraron todas las pinzas mecánicas LOVO y se mostró la pantalla de resumen de resultados. Se registraron los datos de la pantalla de resumen de resultados en la Tabla 17. Se cerraron todas las bombas y se filtró el soporte.

A. Cantidad calculada de IL-2 necesaria para el producto final. (300UI/ml de producto final de IL-2): Volumen de producto final (ml) [Volumen de producto celular formulado de la tabla de volumen de producto formulado final] x 300 UI/ml = UI de IL-2 requeridas _____ ml X 300 UI = _____ UI de IL-2 requeridas B. UI de IL-2 requeridas ÷ dilución de solución madre de trabajo (Concentración de 6×10^4 UI/ml) preparada en la etapa de preparación de IL-2 = volumen (ml) de IL-2 para agregar al producto final. _____ UI de IL-2 requeridas de antes] ÷ 60,000 UI/ml = _____ ml de solución madre de trabajo de IL-2

- 10 Se tocó el botón Siguiente. Se mostró la pantalla de selección de protocolo.

Procedimiento de apagado de LOVO

1. Se aseguró de que todas las abrazaderas estuvieran cerradas y que el soporte del filtro estuviera en posición vertical.

2. Se tocó el botón DETENER en la parte delantera del LOVO.

- 15 3. Se mostró la superposición de decisiones del botón DETENER.

4. Se mostró la superposición de confirmación de apagado.

5. Se tocó el botón Sí. Apareció la pantalla de apagado.

6. Después de unos segundos, se mostró la pantalla de apagado. Cuando se mostró esta pantalla, se apagó el LOVO usando el interruptor en la parte posterior izquierda del instrumento.

- 20 Se registró en una tabla el volumen de producto formulado final.

Se calculó la cantidad de IL-2 requerida de la tabla de producto final

A. Cantidad calculada de IL-2 necesaria para el producto final. (300 UI/ml de producto final de IL-2): Volumen de producto final (ml) [Volumen de producto celular formulado de la tabla de volumen del producto formulado final] x 300 UI/ml = UI de IL-2 requeridas _____ ml X 300 UI = _____ UI de IL - 2 requeridas B. UI de IL-2 requeridas ÷ dilución de solución madre de trabajo (concentración de 6×10^4 UI/ml) preparada en la etapa de preparación de IL-2 = volumen (ml) de IL-2 para agregar al producto final. _____ UI de IL-2 requeridas desde antes] ÷ 60,000 UI/ml = _____ ml de solución madre de trabajo de IL-2

Se determinó la cantidad de bolsas criogénicas y el volumen de retención

- 25 Se marcó en el volumen objetivo y la tabla de retención más adelante el número de bolsas de crioconservación y el volumen de la muestra de retención para el producto.

Cálculo de volumen objetivo /bolsa: (Volumen formulado final - ajuste de volumen debido a que no se obtuvo una recuperación del 100% = 10 ml)/# bolsas.

Células preparadas con 1:1 (vol:vol) CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions) e IL-2.

1. Montar y conectar el aparato

5 1.1. Se soldaron en condiciones estériles las bolsas criogénicas CS750 al aparato CC2 Cell Connect reemplazando uno de los extremos luer macho distales de cada bolsa.

1.2. Las abrazaderas se mantuvieron en la posición cerrada.

1.3. Se etiquetaron las bolsas 1-4.

2. Células preparadas con IL-2 y aparato conectado.

10 2.1. En la espiga de BSC se colocó la bolsa de producto celular con un equipo de transferencia de plasma de 4" con conector luer hembra. Se aseguró de que la abrazadera estuviera cerrada en el equipo de transferencia.

2.2. Con una jeringa de tamaño apropiado, se extrajo el volumen de dilución de trabajo de IL-2 determinado a partir de la Tabla de Producto Final.

2.3. Se despachó a producto LOVO.

15 2.4. Bolsa de producto LOVO soldada estéril a la línea de espiga simple CC2 quitando la espiga.

2.5. Se colocaron las células y el aparato en una bolsa de transporte y se colocaron a 2-8°C durante ≤ 15 min.

3. Adición de CS10

3.1. En BSC se adjunta una llave de paso de 3 vías al luer macho en una bolsa de CS10 fría.

3.2. Se adjunta una jeringa del tamaño adecuado a la llave hembra de la llave de paso.

20 3.3. Se desprendió la bolsa y se extrajo la cantidad de CS 10 determinada en la tabla "Volumen de producto formulado final".

3.4. Se retiró la jeringa y se tapó en rojo.

3.5. Cuando se requirieron varias jeringas, se repitió.

3.6. Se retiró el aparato de célula/CC2 del refrigerador a 2-8°C y se colocó en BSC.

25 3.7. Se adjuntó la primera jeringa que contenía CS10 al luer medio de la llave de paso. Se giró la llave de paso para que la línea a las bolsas CS750 estuviera en la posición "APAGADO".

3.8. Lentamente y mezclando suavemente, se añadió CS10 (1:1, vol:vol) a las células.

3.9. Se repitió para jeringas adicionales de CS10.

Adición de producto celular formulado en bolsas criogénicas

30 1. Se reemplazó la jeringa con jeringa de tamaño apropiado para el volumen de células que se colocarán en cada bolsa criogénica.

2. Se mezcló producto de células.

3. Se abrió la abrazadera que conduce a la bolsa del producto celular y se extrajo el volumen apropiado.

35 4. Se giró la llave de paso para que la bolsa de producto celular estuviera en la posición "APAGADO" y se despachó el contenido de la jeringa en la bolsa criogénica # 1. Se despejó la línea con aire de la jeringa.

Se registró el volumen del producto final

1. Utilizando un puerto sin agujas y una jeringa de tamaño apropiado, se extrajo la cantidad de retención determinada previamente.

2. Se colocó lo retenido en un tubo cónico de 50 ml con la etiqueta "Retener"

40 3. El uso de la jeringa unida al arnés se eliminó todo el aire de la bolsa que extrajo las células hasta alrededor de 1 "más allá de la bolsa en el tubo. Se sujetó con abrazaderas y se selló con calor. Se colocó a 2-8°C.

4. Se giró la llave de paso para que las bolsas criogénicas estuvieran en la posición "APAGADO"
5. Se mezclaron las células en la bolsa de producto celular y se repitieron las etapas 3-8 para las bolsas CS750 restantes usando una nueva jeringa en la llave de paso y una nueva jeringa para obtener la retención de células.
6. El producto retenido debe reservarse para su tratamiento una vez que el producto estuviera en CRF.
- 5 Procedimiento de congelador de velocidad controlada (CRF) (véase también el Ejemplo 9)
 1. Se encendió el CRF (congelador de velocidad controlada CryoMed, modelo 7454) y el ordenador portátil asociado.
 2. Se conectó a el ordenador con una cuenta y una contraseña.
 3. Se abrió ícono de congelador de velocidad controlada ubicado en el escritorio.
- 10
 4. Se hizo clic en el botón Ejecutar en la pantalla principal.
 5. Se hizo clic en Abrir perfil, se hizo clic en Abrir.
 6. Se ingresó el nombre del archivo de ejecución seguido de la fecha en este formato: runMMDDYYYY.
 7. Se ingresó la etiqueta de datos como fecha sin guiones como MMDDYYYY.
 8. Puerta cerrada al CRF.
- 15
 9. Se hizo clic en Iniciar ejecución.
 10. Seleccionado COM 6 en el menú desplegable.
 11. Hizo clic en Aceptar. Esperó unos 30 segundos.
 12. Cuando apareció "Descarga de perfil", se hizo clic en Aceptar. Se hizo clic en Guardar. (Véase el Ejemplo 9 para obtener detalles del perfil de congelación de velocidad controlada).
- 20
 13. Se esperó para presionar el botón verde hasta que las muestras estuvieron en el CRF. El congelador se mantuvo a 4°C hasta que estuvo listo para agregarlos.
 14. Se agregaron muestras a CRF.
 15. Se esperó hasta que CRF se volvió a 4°C. Una vez que se alcanzó la temperatura, se hizo clic en el botón verde de continuar. Este programa inició para ir a la siguiente etapa del programa.
- 25
 16. Se realizó una inspección visual de las bolsas criogénicas para lo siguiente (Nota: no inspeccionó el llenado excesivo o insuficiente): integridad del contenedor, integridad del puerto, integridad del sello, presencia de grumos de células y presencia de partículas.
 17. Se colocó etiquetas colgantes aprobadas en cada bolsa.
- 30
 18. Se verificó etiqueta del producto final que incluía: número de lote, nombre del producto, fecha del fabricante, volumen del producto, otros aditivos, temperatura de almacenamiento y vencimiento.
 19. Se colocó cada bolsa criogénica (con etiqueta colgante) en una bolsa superior.
 20. Se selló al calor.
 21. Se colocó en un casete frío.
 22. Se repitió para cada bolsa.
- 35
 23. Se colocaron las bolsas criogénicas etiquetadas en casetes preacondicionados y se transfirieron al CRF.
 24. Se distribuyó uniformemente los casetes en el bastidor del CRF.
 25. Se aplicó un termopar de cinta al casete central o se colocó la bolsa falsa en la posición central.
 26. Se cerró la puerta del CRF.
- 40
 27. Una vez que la temperatura de la cámara alcanzó los 4°C +/- 1.5°C, se tocó Ejecutar en el software de interfaz de PC.
 28. Se registró el tiempo y la temperatura de la cámara en que el producto se transfiere al CRF.

Tratamiento de muestra de control de calidad

1. Transferir asépticamente los siguientes materiales a la BSC, según fuera necesario, y etiquetarlos de acuerdo con la siguiente tabla:

2. Se utilizó una pipeta nueva para pipetear lo siguiente:

5 Tabla de retención y control de calidad

3. Se entregó al control de calidad: 1 tubo de recuento de células, 1 tubo de endotoxina, 1 tubo de micoplasma, 1 tubo de tinción de gramo, 1 tubo de tubo de reestimulación y 1 tubo de flujo al control de calidad para una prueba inmediata. Los tubos duplicados restantes se colocaron en el congelador de velocidad controlada.

4. Se comunicó con el supervisor de control de calidad para notificarle las pruebas requeridas.

10 5. Véase la Tabla 18 para obtener instrucciones de prueba y almacenamiento.

TABLA 18. Instrucciones de prueba y almacenamiento.

Prueba	Recipiente
Recuento y viabilidad de células	Crioviales.
Micoplasma	Criovial almacenado a 4 °C hasta completar la prueba.
Esterilidad	Inocular 0.5 mL a una botella de cultivo anaeróbico y 0.5mL de cultivo aeróbico.
Tinción de Gram	Criovial almacenado a 4 °C hasta completar la prueba.
Endotoxina	Criovial almacenado a 4 °C hasta completar la prueba.
Flujo	Criovial almacenado a 4 °C hasta completar la prueba.
Retención pos-formulación	Crioconservar para futuras pruebas: Consiste en 5 viales satélites, 1 – recuento de célula, 1- tubo de endotoxina, 1-tubo de micoplasma, 1-tubo de tinción de Gram, y 1-tubo de flujo para CC para prueba inmediata.
Re-estimulación	La muestra se entrega a temperatura ambiente y el ensayo debe iniciarse dentro de 30 minutos de los resultados de recuento de células.

Recuento de células

15 Se realizó un solo recuento de células en cada muestra y se registraron datos y se adjuntaron los datos brutos de recuento al registro por lotes. Se documentó el programa de recuento del Cellometer. Se verificó que se hubiera ingresado la dilución correcta al Cellometer.

Crioconservación de células de retención posteriores a la formulación:

1. Se colocó vial en CRF.

20 2. Se trasladó a la ubicación de almacenamiento después de completar la congelación y se registraron la fecha y la hora de colocación en CFR. La fecha y la hora registradas se trasladaron a LN₂.

Pruebas de microbiología

1. Solicitud de pruebas para placas de sedimentación al laboratorio de microbiología.

2. Números de acceso registrados.

3. Pruebas ordenadas de esterilidad aeróbica y anaeróbica.

25 4. Entrega garantizada de placas y matraces al laboratorio de microbiología.

Crioconservación posterior de bolsas de productos celulares

1. Se detuvo el congelador después de completar la ejecución. La ejecución se pudo detener haciendo clic en el botón Detener o presionando la tecla Atrás en el teclado del congelador.

2. Se retiraron las bolsas criogénicas del casete
3. Se transfirieron casetes a la fase de vapor LN₂.
4. Ubicación de almacenamiento registrada.
5. Se ingresaron comentarios adicionales cuando la ventana de ingreso de texto se abrió nuevamente. Esta ventana apareció independientemente del procedimiento de detener ejecución.
6. Se imprimió el informe de perfil y se adjuntó al registro de lote etiquetado con el número de lote para la ejecución.
7. Finalizó el modo de calentamiento y se cerró la pantalla Ejecutar con el botón Salir.

EJEMPLO 9: PROCEDIMIENTO DE CRIOCONSERVACIÓN

- 10 Este ejemplo describe el procedimiento del proceso de crioconservación para TIL preparados con el procedimiento cerrado abreviado descrito anteriormente en el Ejemplo 8 usando el congelador de velocidad controlada CryoMed, modelo 7454 (Thermo Scientific).

El equipo utilizado, además del descrito en el Ejemplo 9, es el siguiente:

- 15 Estante de soporte de casetes de aluminio (compatible con las bolsas para congelador CS750), casetes de almacenamiento criogénico para bolsas de 750 ml, tanque de nitrógeno líquido de baja presión (22 psi), refrigerador, sensor de termopar (tipo cinta para bolsas) y bolsas de congelación CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

- 20 El procedimiento de congelación proporciona una velocidad de 0.5°C desde la nucleación hasta -20°C y una velocidad de enfriamiento de 1°C por minuto hasta la temperatura final de -80°C. Los parámetros del programa son los siguientes:

Etapa 1: espere a 4°C; Etapa 2: 1.0°C/min (temperatura de la muestra) a -4°C; Etapa 3: 20.0°C/min (temperatura de la cámara) a -45°C; Etapa 4: 10.0°C/min (temperatura de la cámara) a -10.0°C; Etapa 5: 0.5°C/min (temperatura de la cámara) a -20°C; y Etapa 6: 1.0°C/min (temperatura de la muestra) a -80°C.

- 25 En la Figura 11 se mostró una descripción del procedimiento de este ejemplo junto con el procedimiento de los Ejemplos 1 a 8.

EJEMPLO 10: CARACTERIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO 2A TILS

- Este ejemplo describe la caracterización de los TIL preparados con el procedimiento cerrado abreviado descrito anteriormente. En resumen, el procedimiento cerrado abreviado (procedimiento 2A, descrito en los Ejemplos 1 a 9) tenía las ventajas sobre los procedimientos de fabricación de TIL anteriores que se indican en la Tabla 19.
- 30 Las ventajas para el Pre-REP pueden incluir: mayor cantidad de fragmentos tumorales por matraz, menor tiempo de cultivo, número reducido de etapas y/o ser susceptible a un sistema cerrado. Las ventajas para la transición de Pre-REP a REP pueden incluir: procedimiento pre-REP-a-REP abreviado, número reducido de etapas, selección de fenotipado eliminada y/o susceptible a sistema cerrado. Las ventajas para el REP pueden incluir: número reducido de etapas, duración del REP más corta, transferencia del sistema cerrado de TIL entre
- 35 matraces y/o intercambios de medios del sistema cerrado. Las ventajas para la recolección pueden incluir: número reducido de etapas, lavado de célula automatizado, sistema cerrado y menor pérdida de producto durante el lavado. Las ventajas para la formulación y/o producto final pueden incluir flexibilidad de envío.

TABLA 19. Comparación del procedimiento ejemplar 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

Etapa de procedimiento	Procedimiento 1C -Forma de realización	Procedimiento 2A-Forma de realización
Pre-REP	• 4 fragmentos por 10 matraces G-REX - 10 • 11-21 Día de duración	• 40 fragmentos por 1 matraz G-REX - 100M • 11 Día de duración
Transición de pre-REP a REP	• Pre-REP TIL se congelan hasta fenotiparse para selección, luego se descongelan para proceder al REP (-Día 30) • REP requiere >40x10⁶ TIL	• Pre-REP TIL se mueven directamente a REP el Día 11 • REP requiere 25-200x10⁶ TIL

ES 3 008 832 T3

Etapa de procedimiento	Procedimiento 1C -Forma de realización	Procedimiento 2A-Forma de realización
REP	• 6 matraces G-REX -100M el Día 0 de REP • 5 x 10 ⁶ TIL y 5 x 10 ⁸ PBMC alimentadoras por matraz el Día 0 de REP • divididos en 18-36 matraces el Día 7 de REP • 14 Día de duración	• 1 matraz G-REX -500M el Día 11 • 25-200x10 ⁶ TIL and 5x10 ⁹ PBMC alimentadoras el Día 11 • divididas en ≤ 6 matraces G-REX -500M el Día 16 • 11 Día de duración
Recolección	• TIL recolectados mediante centrifugación	• TIL recolectados mediante sistema de lavado de células automatizado LOVO
Formulación final	• Producto fresco en Hypothermosol • Bolsa de infusión individual	• Producto crioconservado en PlasmaLyte-A + 1% HSA y CS10 almacenado en LN2 • Alícuotas múltiples
	• Estabilidad de envío limitada	• Estabilidad de envío más larga
Tiempo de procedimiento estimado total	• 43-55 días	• 22 días

Se realizaron un total de 9 experimentos usando TIL derivados de 9 tumores descritos en la Tabla 20. Todos los datos mostrados aquí se midieron a partir del producto TIL congelado descongelado del proceso 1C y una forma de realización del procedimiento 2A.

5 TABLA 20. Descripción de donantes de tumores, fechas de tratamiento y ubicaciones de tratamiento.

ID de tumor ID	Tipo de tejido	Fuente	Tejido
M1061	Melanoma	MT group	Primario – pie lateral izquierdo
M1062	Melanoma	Moffitt	N/A
M1063	Melanoma	MT group	Metastásico C -ingle derecha
M1064	Melanoma	MT group	Metastásico C -tobillo izquierdo
M1065	Melanoma	Bio Options	Metastásico-Nodo linfático de axila
EP11001	ER+PR+	MT group	Carcinoma ductal invasivo de mama izquierda primario
M1056*	Melanoma	Moffitt	N/A
M1058*	Melanoma	MT group	Metastásico – cuero cabelludo derecho etapa IIB
M1023*	Melanoma	Atlantic Health	Primario - axila derecha

Los procedimientos descritos en el presente documento para el procedimiento 2A se utilizaron para producir los TIL para la caracterización en este ejemplo. Brevemente, para el REP, el día 11, un matraz de G-REX -500M que contiene 5 L de CM2 suplementado con 3000 UI/ml de rhil-2, 30ng/mL de anti-CD3 (clon OKT3) y 5 x 10⁹ irradiado se prepararon células PBMC alimentadoras alogénicas. Los TIL recogidos del matraz pre-REP G-REX -100M después de la reducción de volumen se contaron y se sembraron en el matraz G-REX -500M a una densidad que varió entre 5 x 10⁶ y 200 x 10⁶ células. Más adelante, el matraz se colocó en una incubadora humidificada de cultivo de tejidos con CO₂ al 5% a 37°C durante cinco días. El día 16, se redujo el volumen del matraz G-REX -500M, se contaron los TIL y se determinó su viabilidad. En este punto, los TIL se expandieron en múltiples matraces G-REX -500M (hasta un máximo de seis matraces), cada uno con una densidad de siembra de 1 x 10⁹ TIL/matraz. Más adelante, todos los matraces se colocaron en incubadoras de cultivo de tejidos con CO₂ al 5% y 37°C humidificadas durante seis días más. El día 22, el día de la recolección, se redujo el volumen de cada matraz en un 90%, se juntaron las células y se filtraron a través de un filtro de sangre de 170 µm, y luego se recogieron en una bolsa Origin EV3000 de 3 L o equivalente en preparación para el lavado

automático el LOVO. Los TIL se lavaron usando el sistema de tratamiento celular automatizado LOVO que reemplazó el 99.99% de los medios de cultivo celular con un regulador de pH de lavado que consistía en PlasmaLyte-A suplementado con HSA al 1%. El LOVO opera utilizando tecnología de membrana de filtración giratoria que recupera más del 92% del TIL al tiempo que elimina virtualmente los componentes residuales del cultivo de tejidos, incluidos el suero, los factores de crecimiento y las citocinas, así como otros desechos y partículas. Una vez completado el lavado, se realizó un recuento de células para determinar la expansión de los TIL y su viabilidad tras la recolección. Se añadió CS10 al TIL lavado en una relación volumen: volumen de 1:1 para lograr la formulación final del Procedimiento 2A. El producto final formulado se dividió en alícuotas en bolsas de almacenamiento criogénico, se selló y se colocó en casetes de aluminio preenfriados. Las bolsas de almacenamiento criogénico que contenían TIL se congelaron luego usando un congelador de velocidad controlada CryoMed (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento, incluido el Ejemplo 9.

En las Figuras 12 y 13 se compararon los recuentos de células y el porcentaje de viabilidad de las nueve ejecuciones.

Los marcadores de superficie celular que se mostraron en los siguientes resultados se analizaron usando citometría de flujo (citómetro de flujo Canto II, Becton, Dickinson, and Co., Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) usando reactivos adecuados disponibles comercialmente. Los resultados de los marcadores de interés se mostraron en la Figura 14 a la Figura 23.

Se han utilizado diversos procedimientos para medir la longitud de los telómeros en preparaciones citológicas y de ADN genómico. El análisis de fragmentos de restricción de telómeros (TRF) es el estándar de oro para medir la longitud de los telómeros (de Lange et al., 1990). Sin embargo, la principal limitación de TRF es el requisito de una gran cantidad de ADN (1.5 µg). Aquí, se aplicaron dos técnicas ampliamente utilizadas para la medición de la longitud de los telómeros, a saber, hibridación in situ de fluorescencia (FISH) y PCR cuantitativa.

Flow-FISH se realizó utilizando el kit Dako kit (K532711-8 RUO Code K5327 Telomere PNA/FITC para citometría de flujo, kit PNA FISH/FITC. Flujo, 20 pruebas) y se siguieron las instrucciones del fabricante para medir la longitud media de repetición del telómero. Brevemente, la superficie de las células se tiñó con CD3 APC durante 20 minutos a 4°C, seguido de GAM Alexa 546 durante 20 minutos. Más adelante, el complejo antígeno-anticuerpo se reticuló con reticulante químico BS3 (Fisher Scientific) de 2 mM. La unión de la sonda de PNA-telómero en una población estándar de células T con telómeros largos, línea celular de leucemia Jurkat 1301 T (células 1301), se usó como patrón de referencia interno en cada ensayo. Los TIL individuales se contaron después de la incubación del anticuerpo y se mezclaron con 1301 células (ATCC) en una relación de células 1:1. Se mezclaron 5×10^5 TIL con 5×10^5 células 1301. La hibridación in situ se realizó en solución de hibridación (formamida al 70%, BSA al 1%, Tris 20 mM pH 7.0) por duplicado y en presencia y ausencia de una sonda de PNA de telómero conjugado con FITC (Panagene), FITC-00-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA, suplementaria a la secuencia de repetición del telómero a una concentración final de 60 nM. Después de la adición de la sonda Telomere PNA, las células se incubaron durante 10 minutos a 81°C en un baño de agua con agitación. Más adelante, las células se colocaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. A la mañana siguiente, se eliminó el exceso de sonda de telómero lavando 2 veces con PBS precalentado a 40°C. Después de los lavados, se añadió DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA) a una concentración final de 75 ng/mL. La tinción de ADN con DAPI se usó para bloquear células en la población G0/G1. El análisis de la muestra se realizó utilizando nuestro citómetro de flujo (BD Canto II, Mountain View, CA). La fluorescencia del telómero de la muestra de prueba se expresó como un porcentaje de la fluorescencia (fl) de las células 1301 según la siguiente fórmula: Longitud relativa del telómero = [(células de prueba FITC fl media con sonda - células de prueba FITC fl medias sin sonda) × índice de ADN células 1301 × 100]/[(células FITC fl 1301 promedio con sonda - células FITC fl 1301 promedio sin sonda) × célula de prueba de índice de ADN].

También se usó qPCR en tiempo real para medir la longitud relativa de los telómeros (Nucleic Acids Res. 2002 May 15; 30(10): e47., 20, Leukemia, 2013, 27, 897-906). Brevemente, se determinó la relación entre el número de copias repetidas de telómeros y el número de copias de un solo gen (T/S) usando un termociclador BioRad PCR (Hercules, CA) en un formato de 96 pocillos. Se utilizaron diez ng de ADN genómico para la reacción de PCR de telómero o hemoglobina (hgb) y los cebadores utilizados fueron los siguientes: cebador Tel-1b (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), cebador Tel-2b (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT), cebador hgb1 (GCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC), y cebador hgb2 (CACCAACTTCATCCACGTTCCACC). Todas las muestras se analizaron mediante las reacciones de los telómeros y la hemoglobina, y el análisis se realizó por triplicado en la misma placa. Además de las muestras de prueba, cada placa de 96 pocillos contenía una curva estándar de cinco puntos de 0.08 ng a 250 ng utilizando ADN genómico aislado de la línea celular 1301. La relación T/S (-dCt) para cada muestra se calculó restando el valor mediano del ciclo umbral de hemoglobina (Ct) del valor mediano de Ct del telómero. La relación T/S relativa (-ddCt) se determinó restando la relación T/S del punto de curva estándar de 10.0 ng de la relación T/S de cada muestra desconocida.

Los resultados de Flow-FISH se mostraron en las Figuras 24 y 25, y no se observaron diferencias significativas entre el proceso 1C y el procedimiento 2A, lo que sugiere que las propiedades sorprendentes de los TIL producidos por el procedimiento 2A no eran predecibles a partir de la edad de los TIL solos.

En conclusión, el procedimiento 2A produjo un potente producto TIL con un fenotipo "joven" definido por altos niveles de moléculas coestimuladoras, bajos niveles de marcadores de agotamiento y una mayor capacidad para secretar citocinas tras la reactivación. La plataforma de expansión abreviada del día 22 permite la generación rápida de dosis a escala clínica de TIL para pacientes con necesidad urgente de terapia. El producto farmacéutico crioconservado introduce eficiencias logísticas críticas que permiten una fabricación rápida y flexibilidad en la distribución. Este procedimiento de expansión supera las barreras tradicionales para la aplicación más amplia de la terapia TIL.

EJEMPLO 11: USO DE CÓCTEL DE CITOCINA DE IL-2, IL-15 E IL-21

Este ejemplo describe el uso de citocinas IL-2, IL-15 e IL-21, que sirven como factores de crecimiento de células T adicionales, en combinación con el procedimiento TIL de los Ejemplos 1 a 10.

Usando el procedimiento de los Ejemplos 1 a 10, se cultivaron TIL a partir de tumores colorrectales, de melanoma, cervicales, de mama triple negativo, pulmón y renales en presencia de IL-2 en un brazo del experimento y, en lugar de IL-2, una combinación de IL-2, IL-15 e IL-21 en otro brazo al inicio del cultivo. Al finalizar el pre-REP, se evaluaron los cultivos para determinar la expansión, el fenotipo, la función (CD107a+ e IFN- γ) y el repertorio de TCR V β . IL-15 e IL-21 se describen en otra parte de este documento y en Grujil, et al., IL-21 promueve la expansión de linfocitos infiltrantes de tumores CD27+ CD28+ con alto potencial citotóxico y baja expansión colateral de células T reguladoras, Santeagoets, S. J., J Transl Med., 2013, 11:37 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/>).

Los resultados mostraron que la expansión de TIL mejorada (>20%), tanto en células CD4+ como CD8+ en las condiciones tratadas con IL-2, IL-15 e IL-21 se observó en múltiples histologías relativas en las condiciones de solo IL-2. Hubo un sesgo hacia una población predominantemente de CD8+* con un repertorio TCR V β sesgado en los TIL obtenidos de los cultivos tratados con IL-2, IL-15 e IL-21 en relación con los cultivos de solo IL-2. IFN- γ y CD107a estaban elevados en los TIL tratados con IL-2, IL-15 e IL-21, en comparación con los TIL tratados solo con IL-2.

EJEMPLO 12: FASE 2, MULTICENTRO, ESTUDIO DE TRES COHORTES EN MELANOMA

Este estudio de fase 2, multicéntrico, de tres cohortes está diseñado para evaluar la seguridad y eficacia de una terapia TIL fabricada de acuerdo con el proceso 1C (como se describe en el presente documento) en pacientes con melanoma metastásico. Las cohortes uno y dos inscribirán hasta 30 pacientes cada una y la cohorte tres es una cohorte de retratamiento para una segunda infusión de TIL en hasta diez pacientes. Las dos primeras cohortes están evaluando dos procedimientos de fabricación diferentes: los procedimientos 1C y una forma de realización del procedimiento 2A (descrito en los Ejemplos 1 a 10, respectivamente). Los pacientes de la cohorte uno (1) reciben TIL frescos no crioconservados y los pacientes de la cohorte dos (2) reciben el producto fabricado a través del procedimiento descrito en los Ejemplos 1 a 10, produciendo un producto crioconservado. El diseño del estudio se mostró en la Figura 26. El estudio es un estudio de fase 2, multicéntrico, de tres cohortes para evaluar la seguridad y eficacia de los TIL autólogos para el tratamiento de subpoblaciones de pacientes con melanoma metastásico. Los criterios de inclusión clave incluyen: melanoma metastásico medible y ≥ 1 lesión resecable para la generación de TIL; al menos una línea previa de terapia sistémica; edad ≥ 18 ; y estado funcional ECOG de 0-1. Las cohortes de tratamiento incluyen productos TIL no crioconservados (preparados usando el procedimiento 1C), producto TIL crioconservado (preparado usando una forma de realización del procedimiento 2A) y re-tratamiento con producto TIL para pacientes sin respuesta o que progresan después de la respuesta inicial. El criterio de valoración principal es la seguridad y el criterio de valoración secundario es la eficacia, definida como tasa de respuesta objetiva (TRG), tasa de remisión completa (CRR), supervivencia libre de progresión (SLP), duración de la respuesta (DOR) y supervivencia global (SG).

EJEMPLO 13: LOTES INDIVIDUALES DE CALIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS IRRADIADAS CON GAMMA

Este ejemplo describe un procedimiento abreviado nuevo para calificar lotes individuales de células mononucleares periféricas irradiadas con rayos gamma (PBMC, también conocidas como MNC) para su uso como células alimentadoras alogénicas en los procedimientos ejemplares descritos en este documento.

Cada lote de alimentador de MNC irradiado se preparó a partir de un donante individual. Cada lote o donante se seleccionó individualmente para determinar su capacidad para expandir TIL en el REP en presencia de anticuerpo anti-CD3 (clon OKT3) purificado e interleucina-2 (IL-2). Además, cada lote de células alimentadoras se probó sin la adición de TIL para verificar que la dosis recibida de radiación gamma era suficiente para hacer que su replicación fuera incompetente.

Definiciones/Abreviaturas

BSC - Cabina de seguridad biológica

CD3 - Clúster de diferenciación 3; linfocitos T de proteína marcadora de superficie

CF - Centrífuga

5 CM2 - Medio completo para TIL #

CMO - Organización de fabricación por contrato

CO₂ - Dióxido de carbono

EtOH - alcohol etílico

GMP - Buenas prácticas de fabricación

10 IL-2: interleucina 2

IU - Unidades internacionales

LN2 - Nitrógeno líquido

mini-REP - Protocolo de expansión mini-rápida

ml - mililitro

15 MNC - Células mononucleares

NA - No aplica

OKT3 - Anticuerpo MACS GMP CD3 puro (clon OKT3)

EPI - Equipo de protección personal

Pre-REP: antes del protocolo de expansión rápida

20 QS - Quantum Satis; llenar a esta cantidad

REP - Protocolo de expansión rápida

TIL - Linfocitos infiltrantes de tumores

T25 - Matraz de cultivo de tejidos de 25 cm² ^ {2}

µg - Microgramo

25 µL - Microlitro

PROCEDIMIENTO

Antecedentes

30 7.1.1 Se requirieron células alimentadoras de MNC irradiadas con rayos gamma y detenidas en su crecimiento para REP de TIL. Los receptores de membrana en las MNC del alimentador se unen al anticuerpo anti-CD3 (clon OKT3) y se reticulan con TIL en el matraz de REP, que estimulan la expansión de TIL. Los lotes de alimentación se prepararon a partir de la leucaféresis de sangre entera extraída de donantes individuales. El producto de leucaféresis se sometió a centrifugación sobre Ficoll-Hypaque, se lavó, se irradió y se crioconservó en condiciones de GMP.

35 7.1.2 Es importante que los pacientes que recibieron terapia con TIL no reciban una infusión de células alimentadoras viables, ya que esto puede provocar la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Por tanto, el crecimiento de las células alimentadoras se detiene mediante la dosificación de las células con irradiación gamma, lo que da como resultado roturas del ADN bicatenario y la pérdida de la viabilidad celular de las células MNC tras el recultivo.

Criterios de evaluación y configuración experimental

40 Los lotes de alimentación se evaluaron según dos criterios: 1) su capacidad para expandir TIL en cocultivo > 100 veces y 2) su incompetencia de replicación.

7.2.2 Los lotes de alimentación se probaron en formato mini-REP utilizando dos líneas pre-REP TIL primarias cultivadas en matraces de cultivo de tejidos T25 verticales.

7.2.3 Los lotes de alimentación se probaron frente a dos líneas TIL distintas, ya que cada línea TIL es única en su capacidad de proliferar en respuesta a la activación en un REP.

- 5 7.2.4 Como control, junto con los lotes de prueba se ejecutó un lote de células alimentadoras MNC irradiadas que históricamente se ha demostrado que cumplen con los criterios de 7.2.1.

7.2.5 Para asegurar que todos los lotes probados en un solo experimento reciban pruebas equivalentes, se dispuso de suficientes existencias de las mismas líneas pre-REP TIL para probar todas las condiciones y todos los lotes de alimentadoras.

- 10 7.2.6 Para cada lote de células de alimentación analizadas, hubo un total de seis matraces T25:

7.2.6.1 Línea # 1 de Pre-REP TIL (2 matraces)

7.2.6.2 Línea # 2 de Pre-REP TIL (2 matraces)

7.2.6.3 Control de alimentadoras (2 matraces)

- 15 NOTA: Los matraces que contienen las líneas TIL # 1 y # 2 evaluaron la capacidad del lote alimentador para expandir TIL. Los matraces de control de alimentadoras evaluaron la incompetencia de replicación del lote de las alimentadoras.

Protocolo experimental

7.3.1 Día -2/3, Descongelamiento de líneas TIL

7.3.1.1 Medio CM2 preparado.

- 20 7.3.1.2 CM2 calentado en baño de agua a 37°C.

7.3.1.3 Se prepararon 40 ml de CM2 suplementado con 3000 UI/ml de IL-2. Mantener caliente hasta su uso.

7.3.1.4 Se colocaron 20 ml de CM2 precalentado sin IL-2 en cada uno de los dos tubos cónicos de 50 ml etiquetados con los nombres de las líneas TIL utilizadas.

- 25 7.3.1.5 Se retiraron las dos líneas pre-REP TIL designadas del almacenamiento de LN2 y se transfirieron los viales a la sala de cultivo de tejidos.

7.3.1.6 Identificación de la línea TIL registrada.

7.3.1.7 Matraces descongelados colocándolos dentro de una bolsa de almacenamiento con cremallera sellada en un baño de agua a 37°C hasta que quede una pequeña cantidad de hielo.

7.3.1.8 Viales descongelados rociados o limpios con etanol al 70% y se transfirieron los viales a BSC.

- 30 7.3.1.9 Con una pipeta de transferencia estéril, se transfirieron inmediatamente el contenido del vial a los 20 ml de CM2 en el tubo cónico de 50 ml preparado y etiquetado.

7.3.1.10 QS a 40 ml usando CM2 sin IL-2 para lavar las células.

7.3.1.11 Centrifugado a 400 x CF durante 5 minutos.

- 35 7.3.1.12 Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de CM2 tibio suplementado con 3000 UI/ml de IL-2.

7.3.1.13 Se eliminó una pequeña alícuota (20 µl) por duplicado para el recuento celular utilizando un contador celular automático. Se registró los recuentos.

7.3.1.14 Mientras se realiza el recuento, Se colocó el tubo cónico de 50 ml con células TIL en una incubadora humidificada de 37°C con CO₂ al 5%, con la tapa aflojada para permitir el intercambio de gases.

- 40 7.3.1.15 Concentración celular determinada y TIL diluido a 1×10^6 células/ml en CM2 suplementado con IL-2 a 3000 UI/ml.

7.3.1.16 Se cultivó en 2 ml/pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos en tantos pocillos como fuera necesario en una incubadora humidificada a 37°C hasta el día 0 del mini-REP.

7.3.1.17 Se cultivaron las diferentes líneas TIL en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos independientes para evitar confusiones y una posible contaminación cruzada.

7.3.2 Día 0, iniciar Mini-REP

5 7.3.2.1 Se preparó suficiente medio CM2 para la cantidad de lotes de alimentadores que se analizarán (por ejemplo, para analizar 4 lotes de alimentadores a la vez, se prepararon 800 ml de medio CM2).

7.3.2.2 Se dividió en alícuotas una porción del CM2 preparado en 7.3.2.1 y se suplementó con 3000 UI/ml de IL-2 para el cultivo de las células. (por ejemplo, para analizar 4 lotes de alimentadores a la vez, preparar 500 ml de medio CM2 con 3000 UI/ml de IL-2).

7.3.2.3 El resto del CM2 sin IL-2 se utilizará para el lavado de células como se explica más adelante.

10 7.3.2.4 Trabajando con cada línea TIL por separado para evitar la contaminación cruzada, se retiró la placa de 24 pocillos con cultivo TIL de la incubadora y se transfirió al BSC.

7.3.2.5 Con una pipeta de transferencia estéril o una pipeta de 100-1000 µl y una punta, se extrajo alrededor de 1 ml de medio de cada pocillo de TIL que se utilizará y colóquelo en un pocillo no utilizado de la placa de cultivo tisular de 24 pocillos. Esto se usó para lavar pozos.

15 7.3.2.6 Utilizando una pipeta de transferencia estéril nueva o una pipeta de 100-1000 µl y una punta, se mezcló el medio restante con TIL en los pocillos para resuspender las células y luego se transfirieron la suspensión celular a un tubo cónico de 50 ml etiquetado con el nombre TIL y se registró el volumen.

7.3.2.7 Se lavaron los pocillos con el medio reservado y se transfirió ese volumen al mismo tubo cónico de 50 ml.

20 7.3.2.8 Se centrifugaron las células a 400 x CF para recoger el sedimento celular.

7.3.2.9 Se aspiró el sobrenadante del medio y se resuspendió el sedimento celular en 2-5 ml de medio CM2 que contiene 3000 UI/ml de IL-2, volumen que se utilizará según el número de pocillos recolectados y el tamaño del sedimento; el volumen debe ser suficiente para asegurar una concentración de $> 1.3 \times 10^6$ células/ml.

7.3.2.10 Con una pipeta serológica, se mezcló bien la suspensión celular y se registró el volumen.

25 7.3.2.11 Se retiraron 200 µl para un recuento celular utilizando un contador celular automático.

7.3.2.12 Mientras se cuenta, se colocó el tubo cónico de 50 ml con células TIL en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% a 37°C, con la tapa aflojada para permitir el intercambio de gases.

7.3.2.13 Registro de los recuentos.

30 7.3.2.14 Se retiró el tubo cónico de 50 ml que contenía las células TIL de la incubadora y se resuspendieron las células a una concentración de 1.3×10^6 células/ml en CM2 caliente suplementado con 3000 UI/ml de IL-2. Se devolvió el tubo cónico de 50 ml a la incubadora con la tapa aflojada.

7.3.2.15 Si se desea, se conserva la placa original de 24 pocillos para volver a cultivar cualquier TIL residual.

7.3.2.16 Se repitieron etapas 7.3.2.4 - 7.3.2.15 para la segunda línea TIL.

35 7.3.2.17 Justo antes de plaquear el TIL en los matraces T25 para el experimento, TIL se diluyó 1:10 para una concentración final de 1.3×10^5 células/ml según la etapa 7.3.2.35 más adelante.

Preparar la solución de trabajo MACS GMP CD3 puro (OKT3)

7.3.2.18 Se sacó la solución madre de OKT3 (1 mg/ml) del refrigerador a 4°C y se colocó en BSC.

7.3.2.19 Se utilizó una concentración final de 30 ng/mL de OKT3 en el medio del mini-REP.

40 7.3.2.20 Se necesitaron 600 ng de OKT3 para 20 ml en cada matraz T25 del experimento; esto fue el equivalente a 60 µl de una solución de 10 µg/ml por cada 20 ml, o 360 µl para todos los 6 matraces analizados para cada lote de alimentadoras.

45 7.3.2.21 Para cada lote de alimentadoras analizado, se prepararon 400 µl de una dilución 1:100 de 1 mg/ml de OKT3 para una concentración de trabajo de 10 µg/ml (por ejemplo, para probar 4 lotes de alimentadoras a la vez, se prepararon 1600 µl de una dilución de 1 mg/ml de OKT3: 16 µl de una dilución 1:100 de 1 mg/ml de OKT3 + 1.584 ml de medio CM2 con 3000 UI/ml de IL-2.)

Preparar matraces T25

7.3.2.22 Se etiquetó cada matraz con el nombre de la línea TIL probada, el número de réplica del matraz, el número de lote de las alimentadoras, la fecha y las iniciales del analista.

7.3.2.23 Se llenó el matraz con el medio CM2 antes de preparar las células alimentadoras.

5 7.3.2.24 Se colocaron los matraces en una incubadora de CO₂ al 5% humidificada a 37°C para mantener el medio caliente mientras se esperaba agregar los componentes restantes.

7.3.2.25 Una vez preparadas las células de alimentación, los componentes se agregarían al CM2 en cada matraz.

Preparar solución de trabajo MACS GMP CD3 pura (OKT3).

TABLA 21: Soluciones

Componente	Volumen en matraces de co-cultivo	Volumen de matraces en control (solo alimentadoras)
CM2 + 3000 IU/ml IL-2:	18ml	19ml
MNC: 1.3×10^7 /ml en CM2 + 3000IU IL-2 (concentración final 1.3×10^7 /matraz)	1ml	1ml
OKT3: 10µg/ml en CM2 + 3000 IU IL-2	60µl	60µl
TIL: 1.3×10^5 /ml en CM2 con 3000IU de IL-2 (concentración final 1.3×10^5 /matraz)	1ml	0

Preparar las células de alimentación

7.3.2.26 Se necesitaba un mínimo de 78×10^6 células de alimentación por lote probado para este protocolo. Cada vial de 1 ml congelado por SDBB tenía 100×10^6 células viables tras la congelación. Suponiendo una recuperación del 50% tras la descongelación del almacenamiento de LN2, se recomendó descongelar al menos dos viales de 1 ml de células alimentadoras por lote dando un estimado de 100×10^6 células viables para cada REP. Alternativamente, si se suministra en viales de 1.8 ml, solo un vial proporcionó suficientes células alimentadoras.

7.3.2.27 Antes de descongelar las células alimentadoras, precalentar alrededor de 50 ml de CM2 sin IL-2 para cada lote de alimentadoras a analizar.

7.3.2.28 Se retiraron los viales del lote de alimentadoras designados del almacenamiento de LN2, se colocaron en una bolsa de almacenamiento con cierre y se colocaron en hielo. Viales transferidos a la sala de cultivo de tejidos.

7.3.2.29 Viales descongelados dentro de una bolsa de almacenamiento con cremallera cerrada sumergiéndolos en un baño de agua a 37°C.

7.3.2.30 Se retiraron los viales de la bolsa con cierre, se rocío o se limpió con EtOH al 70% y se transfirieron los viales al BSC.

7.3.2.31 Utilizando una pipeta de transferencia, se transfirió inmediatamente el contenido de los viales de alimentadoras a 30 ml de CM2 caliente en un tubo cónico de 50 ml. Vial lavado con un pequeño volumen de CM2 para retirar las células residuales en el vial.

7.3.2.32 Centrifugado a 400 x CF durante 5 minutos.

7.3.2.33 Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió en 4 ml de CM2 caliente más 3000 UI/ml de IL-2.

7.3.2.34 Se retiraron 200 µl para el recuento celular mediante el contador celular automatizado. Registrados los recuentos.

7.3.2.34 Células resuspendidas a 1.3×10^7 células/ml en CM2 caliente más 3000 UI/ml de IL-2.

7.3.2.34 Células TIL diluidas de 1.3×10^6 células/ml a 1.3×10^5 células/ml. Se trabajó con cada línea TIL de forma independiente para evitar la contaminación cruzada.

Configurar co-cultivo

- 7.3.2.36 Células TIL diluidas de 1.3×10^6 células/ml a 1.3×10^5 células/ml. Se trabajó con cada línea TIL de forma independiente para evitar la contaminación cruzada.
- 7.3.2.36.1 Se agregaron 4.5 ml de medio CM2 a un tubo cónico de 15 ml.
- 5 7.3.2.36.2 Se retiraron las células TIL de la incubadora y se resuspendieron bien con una pipeta serológica de 10 ml.
- 7.3.2.36.3 Se retiraron 0.5 ml de células de la suspensión de TIL 1.3×10^6 células/ml y se añadieron a los 4.5 ml de medio en el tubo cónico de 15 ml. Se devolvió el vial de solución madre de TIL a la incubadora.
- 7.3.2.36.4 Se mezcló bien.
- 7.3.2.36.5 Se repitieron etapas 7.3.2.36.1 - 7.3.2.36.4 para la segunda línea TIL.
- 10 7.3.2.36.6 Si se prueba más de un lote de alimentadoras a la vez, se diluye el TIL a la concentración más baja para cada lote de alimentadoras justo antes de sembrar el TIL.
- 7.3.2.37 Matraces transferidos con medios precalentados para un solo lote de alimentadoras desde la incubadora a la BSC.
- 15 7.3.2.38 Se mezclaron las células alimentadoras pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces con una punta de pipeta de 1 ml y transfiriendo 1 ml (1.3×10^7 células) a cada matraz para ese lote de alimentadoras.
- 7.3.2.39 Se agregaron 60 μ l de solución madre de trabajo de OKT3 (10 μ g/ml) a cada matraz.
- 7.3.2.40 Se devolvieron los dos matraces de control a la incubadora.
- 7.3.2.41 Se transfirió 1 ml (1.3×10^5) de cada lote de TIL al matraz T25 correspondientemente etiquetado.
- 20 7.3.2.42 Los matraces se devolvieron a la incubadora y se incubaron en posición vertical. No se molestó hasta el día 5.
- 7.3.2.43 Se repitieron 7.3.2.36 - 7.3.2.42 para todos los lotes de alimentadoras probados.
- Día 5, cambio de medios
- 7.3.3.1 CM2 preparado con 3000 UI/ml de IL-2. Se necesitan 10 ml para cada matraz
- 25 7.3.3.2 Para evitar la contaminación cruzada, se manipularon los matraces para un solo lote de alimentadoras a la vez. Se retiraron los matraces de la incubadora y se transfirieron a la BSC, se tuvo cuidado de no alterar la capa celular en el fondo del matraz.
- 7.3.3.3 Se repitió para todos los matraces, incluido el matraz de control.
- 7.3.3.4 Con una pipeta de 10 ml, se transfirieron 10 ml de CM2 caliente con 3000 UI/ml de IL-2 a cada matraz.
- 30 7.3.3.5 Se devolvieron los matraces a la incubadora y se incubaron en posición vertical hasta el día 7. Se repitieron 7.3.3.1 - 7.3.3.6 para todos los lotes de alimentadores analizados.
- Día 7, Recolección
- 7.3.4.1 Para evitar la contaminación cruzada, manipular los matraces para un solo lote de alimentadoras a la vez.
- 35 7.3.4.2 Se retiraron los matraces de la incubadora y se transfirieron a la BSC, teniendo cuidado de no alterar la capa de células en el fondo del matraz.
- 7.3.4.3 Sin alterar las células que crecen en el fondo de los matraces, se extrajeron 10 ml de medio de cada matraz de prueba y 15 ml de medio de cada uno de los matraces de control.
- 7.3.4.4 Con una pipeta serológica de 10 ml, se resuspendieron las células en el medio restante y se mezclaron bien para disolver los grumos de células.
- 40 7.3.4.5 Se registraron los volúmenes de cada matraz.
- 7.3.4.6 Después de mezclar bien la suspensión celular mediante pipeteo, se extraen 200 μ l para el recuento celular.
- 7.3.4.7 Contar el TIL usando el procedimiento operativo estándar apropiado junto con el equipo contador celular automático.

7.3.4.8 Recuentos registrados en el día 7.

7.3.4.9 Se repitieron 7.3.4.1 - 7.3.4.8 para todos los lotes de alimentadoras probados.

5 7.3.4.10 Se evaluó la incompetencia de replicación de los matraces de control de alimentadoras y se evaluó la expansión múltiple de los matraces que contenían TIL desde el Día 0 de acuerdo con los criterios enumerados en la Tabla 21 (más adelante).

Día 7, continuación de los matraces de control de alimentadoras hasta el día 14

7.3.5.1 Después de completar los recuentos del día 7 de los matraces de control de alimentadoras, se agregaron 15 ml de medio CM2 fresco que contenía 3000 UI/ml de IL-2 a cada uno de los matraces de control.

10 7.3.5.2 Se devolvieron los matraces de control a la incubadora y se incubaron en posición vertical hasta el día 14.

Día 14, no proliferación extendida de matraces de control de alimentadoras

7.3.6.1 Para evitar la contaminación cruzada, los matraces se manipularon para un solo lote de alimentadoras a la vez.

15 7.3.6.2 Se retiraron los matraces de la incubadora y se transfirieron a la BSC; se tuvo cuidado de no alterar la capa de células en el fondo del matraz.

7.3.6.3 Sin alterar las células que crecen en el fondo de los matraces, se extrajo alrededor de 17 ml de medio de cada matraz de control.

7.3.6.4 Con una pipeta serológica de 5 ml, se resuspendieron las células en el medio restante y se mezclaron bien para disolver los grumos de células.

20 7.3.6.5 Se registraron los volúmenes de cada matraz.

7.3.6.6 Después de mezclar a fondo la suspensión celular mediante pipeteo, se extrajeron 200 µl para el recuento celular.

7.3.6.7 Se contaron los TIL usando el procedimiento operativo estándar apropiado junto con el equipo contador celular automático.

25 7.3.6.8 Recuentos registrados.

7.3.6.9 Se repitieron 7.3.4.1 - 7.3.4.8 para todos los lotes de alimentadoras probados.

RESULTADOS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Resultados

30 10.1.1 La dosis de irradiación gamma fue suficiente para que la replicación de las células alimentadoras fuera incompetente. Se esperaba que todos los lotes cumplieran los criterios de evaluación y también demostraron una reducción en el número total viable de células alimentadoras restantes en el día 7 del cultivo de REP en comparación con el día 0.

10.1.2 Se esperaba que todos los lotes de alimentadoras cumplieran con los criterios de evaluación de expansión de 100 veces el crecimiento de TIL para el día 7 del cultivo REP.

35 10.1.3 Se esperaba que los recuentos del día 14 de matraces de control de alimentadoras continuaran la tendencia no proliferativa observada en el día 7.

Criterios de aceptación

10.2.1 Se cumplieron los siguientes criterios de aceptación para cada línea TIL replicada probada para cada lote de células alimentadoras

40 10.2.2 La aceptación fue doble, como se indica más adelante (que se describe en la tabla siguiente).

TABLA 22: Criterios de aceptación

Prueba	Criterios de aceptación
Irradiación de MNC /incompetencia de replicación	Sin crecimiento observado a los 7 y 14 días

Expansión de TIL	Al menos una expansión de 100 veces de cada TIL (mínimo de 1.3×10^7 células viables)

10.2.2.1 Se evaluó si la dosis de radiación era suficiente para hacer que la replicación de las células alimentadoras MNC fuera incompetente cuando se cultivaba en presencia de 30 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2.

- 5 10.2.2.1.1 La incompetencia de replicación se evaluó mediante el recuento total de células viables (TVC) según se determinó mediante el recuento celular automatizado el día 7 y el día 14 del REP.

10.2.2.1.2 El criterio de aceptación fue "Sin crecimiento", lo que significa que el número total de células viables no ha aumentado el día 7 y el día 14 desde el número de células viables inicial puesto en cultivo el día 0 del REP.

- 10 10.2.2.2 Se evaluó la capacidad de las células alimentadoras para soportar la expansión de TIL.

10.2.2.2.1 El crecimiento de TIL se midió en términos de expansión múltiple de células viables desde el inicio del cultivo en el día 0 del REP hasta el día 7 del REP.

- 15 10.2.2.2.1 El día 7, los cultivos de TIL lograron una expansión mínima de 100 veces, (es decir, más de 100 veces el número de células TIL viables totales puestas en cultivo el día 0 de REP), según se evaluó mediante el recuento celular automatizado.

10.2.2.3 Si un lote no cumpliera con los dos criterios anteriores, el lote se volvió a analizar de acuerdo con el plan de contingencia descrito en la Sección 10.3 más adelante.

- 20 10.2.2.4 Después de repetir la prueba de un lote fallido, se excluyó cualquier lote de alimentadoras de MNC que no cumpliera con los dos criterios de aceptación tanto en la evaluación original como en la prueba de contingencia.

10.2.2.5 Se excluyó cualquier lote de alimentadoras de MNC que cumpliera con los criterios de aceptación pero que se considerara que tenía un rendimiento deficiente en cuanto a la capacidad de expandir TIL en relación con otros lotes de alimentadoras anteriores probados en paralelo con las mismas líneas de TIL pre-REP.

Pruebas de contingencia de lotes de alimentadoras MNC que no cumplen con los criterios de aceptación

- 25 10.3.1 En el caso de que un lote de alimentadoras de MNC no cumpliera con ninguno de los criterios de aceptación descritos en la Sección 10.2 anterior, se tomarán las siguientes etapas para volver a probar el lote y descartar un error simple del experimentador como su causa.

- 30 10.3.2 Si quedan dos o más viales de prueba satélite del lote, el lote se volvió a analizar. Si había uno o ningún matraz de prueba satélite restante del lote, entonces el lote falló de acuerdo con los criterios de aceptación enumerados en la Sección 10.2 anterior.

10.3.3 Dos personas capacitadas, incluida la persona original que evaluó el lote en cuestión, probaron ambas el lote al mismo tiempo.

10.3.4 Se repitió la Sección 7.2 - 7.3 para reevaluar el lote en cuestión.

- 35 10.3.5 Cada persona analizó el lote en cuestión, así como un lote de control (como se define en la Sección 7.2.4 anterior).

10.3.6 Para ser calificado, el lote en cuestión y el lote de control tenían que cumplir con los criterios de aceptación de la Sección 10.2 para el personal que realizaba las pruebas de contingencia.

10.3.7 Una vez cumplidos estos criterios, el lote se entregó para uso de CMO como se describe en la Sección 10.2 anterior.

- 40 **EJEMPLO 14: LOTES INDIVIDUALES DE CALIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA IRRADIADA CON GAMMA**

- 45 Este ejemplo describe un procedimiento abreviado nuevo para calificar lotes individuales de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) irradiadas con rayos gamma para su uso como células alimentadoras alogénicas en los procedimientos ejemplares descritos en el presente documento. Este ejemplo proporciona un protocolo para la evaluación de lotes de células PBMC irradiadas para su uso en la producción de lotes clínicos de TIL. Cada lote de PBMC irradiado se preparó a partir de un donante individual. En el transcurso de más de 100 protocolos de calificación, se demostró que, en todos los casos, los lotes de PBMC

irradiados de SDBB (Banco de sangre de San Diego) se expanden TIL > 100 veces el día 7 de un REP. Este protocolo de calificación modificado estaba destinado a aplicarse a lotes de PBMC de donantes irradiados de SDBB que luego se sometieron a pruebas adicionales para verificar que la dosis recibida de radiación gamma era suficiente para hacerlos incompetentes para la replicación. Una vez que se demostró que mantuvieron la incompetencia de replicación durante el transcurso de 14 días, los lotes de PBMC de donantes se consideraron "calificados" para su uso en la producción de lotes clínicos de TIL.

Términos y definiciones clave

µg - Microgramo

µl - Microlitro

10 AIM-V - cabina de seguridad biológica de medio de cultivo celular disponible comercialmente

BSC - Clúster de diferenciación

CD - Medio completo para TIL # 2

CM2 - CM2 suplementado con 3000 UI/ml de IL-2

CM2IL2 - Organización de fabricación por contrato

15 CO₂ - Dióxido de carbono

EtOH - Etanol

GMP - Buenas prácticas de fabricación

Gy - Gris

IL - Interleucina

20 IU - Unidades internacionales

LN2 - Nitrógeno líquido

ml - mililitro

NA - No aplica

OKT3: designación de anticuerpo monoclonal anti-CD3

25 P20 - pipeta 2-20µl

P200 - pipeta de 20-200 µl

PBMC - células mononucleares de sangre periférica

P1000 - pipeta de 100-1000µl

EPI - Equipo de protección personal

30 REP - Protocolo de expansión rápida

SDBB - Banco de sangre de San Diego

TIL - Linfocitos infiltrantes de tumores

T25 - Matraz de cultivo de tejidos de 25cm²

x g - "multiplicado por la gravedad" - medida de la fuerza centrífuga relativa

35 Las muestras incluyen PBMC de donantes irradiados (SDBB).

Procedimiento

Antecedentes

7.1.1 Se requirieron PBMC irradiadas con rayos gamma, con crecimiento detenido para el REP estándar actual de TIL. Los receptores de membrana en las PBMC se unen al anticuerpo anti-CD3 (clon OKT3) y se reticulan con TIL en cultivo, lo que estimula la expansión de TIL. Se prepararon lotes de PBMC a partir de la leucaféresis

de sangre entera extraída de donantes individuales. El producto de leucaféresis se sometió a centrifugación sobre Ficoll-Hypaque, se lavó, se irradió y se criopreservó en condiciones de GMP.

- 5 Es importante que los pacientes que recibieron terapia con TIL no reciban una infusión de PBMC viables, ya que esto podría provocar la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Por lo tanto, el crecimiento de las PBMC de donantes se detiene mediante la dosificación de las células con irradiación gamma, lo que da como resultado roturas del ADN bicatenario y la pérdida de la viabilidad celular de las PBMC tras el recultivo.

Criterios de evaluación

7.2.1 El criterio de evaluación para lotes de PBMC irradiados fue su incompetencia de replicación.

Configuración experimental

- 10 7.3.1 Los lotes de alimentadoras se probaron en formato mini-REP como si fueran a co-cultivarse con TIL, utilizando matraces de cultivo de tejidos T25 verticales.

7.3.1.1 Lote de control: Un lote de PBMC irradiadas, que se había demostrado históricamente que cumplían con el criterio de 7.2.1, se ejecutó junto con los lotes experimentales como control.

7.3.2 Para cada lote de PBMC de donantes irradiados analizados, se ejecutaron matraces por duplicado.

- 15 Protocolo experimental

Todo el trabajo de cultivo de tejidos en este protocolo se realizó utilizando una técnica estéril en una BSC.

Día 0

7.4.1 Se prepararon ~90 ml de medio CM2 para cada lote de PBMC del donante que debe analizarse. Mantener CM2 caliente en un baño de agua a 37°C.

- 20 7.4.2 Se descongeló una alícuota de 6×10^6 UI/ml de IL-2.

7.4.3 Se devolvió el medio CM2 a la BSC, limpiando con EtOH al 70% antes de colocarlo en la campana. Para cada lote de PBMC analizado, se extrajo alrededor de 60 ml de CM2 a una botella estéril separada. Se agregó IL-2 de la solución madre descongelada de 6×10^6 UI/ml a este medio para una concentración final de 3000 UI/ml. Se etiquetó esta botella como "CM2/IL2" (o similar) para distinguirla del CM2 sin suplementar.

- 25 7.4.4 Etiquetados dos matraces T25 por cada lote de PBMC que se va a analizar. Etiqueta mínima incluida:

7.4.4.1 Número de lote

7.4.4.2 Número de matraz (1 o 2)

7.4.4.3 Fecha de inicio del cultivo (día 0)

Preparar OKT3

- 30 7.4.5 Se extrajo la solución madre de anti-CD3 (OKT3) del refrigerador a 4°C y se colocó en la BSC.

7.4.6 Se utilizó una concentración final de 30 ng/mL de OKT3 en el medio del mini-REP.

7.4.7 Se preparó una solución de trabajo de 10 µg/ml de anti-CD3 (OKT3) a partir de la solución madre de 1 mg/ml. Colocar en el refrigerador hasta necesitarse.

- 35 7.4.7.1 Para cada lote de PBMC analizado, preparar 150 µl de una dilución 1:100 de la solución madre anti-CD3 (OKT3)

Por ejemplo, para analizar 4 lotes de PBMC a la vez, preparar 600 µl de 10 µg/ml de anti-CD3 (OKT3) agregando 6 µl de la solución madre de 1 mg/ml a 594 µl de CM2 suplementado con 3000 UI/ml de IL-2.

Preparar matraces

- 40 7.4.8 Se añadieron 19 ml por matraz de CM2/IL-2 a los matraces T25 etiquetados y se colocaron los matraces en una incubadora de CO₂ al 5% humidificada a 37°C mientras se preparaban las células.

Preparar PBMC irradiadas

7.4.9 Se trabajó con cada lote de PBMC de donante individualmente para evitar la posible contaminación cruzada de los lotes.

- 7.4.10 Viales recuperados de lotes de PBMC que se analizarán a partir del almacenamiento de LN2. Estos se colocaron a -80°C o se mantuvieron en hielo seco antes de descongelarlos.
- 5 7.4.11 Se colocan 30 ml de CM2 (sin suplemento de IL-2) en tubos cónicos de 50 ml para cada lote a descongelar. Se etiquetó cada tubo con los diferentes números de lote de PBMC a descongelar. Se taparon de manera ajustada los tubos y se colocaron en un baño de agua a 37°C antes de usarlos. Según era necesario, se devolvieron los tubos cónicos de 50 ml a la BSC, limpiando con EtOH al 70% antes de colocarlos en la campana.
- 10 7.4.12 Se extrajo un vial de PBMC del almacenamiento en frío y se colocó en un estante de tubos flotantes en un baño de agua a 37°C para descongelarlo. Se dejó que continúe la descongelación hasta que quede una pequeña cantidad de hielo en el vial.
- 7.4.13 Vial descongelado rociado o limpiado con EtOH al 70% y transferido a BSC.
- 7.4.14 Con una pipeta de transferencia estéril, se transfirieron inmediatamente el contenido del vial a los 30 ml de CM2 en el tubo cónico de 50 ml. Se retiró alrededor de 1 ml de medio del tubo para enjuagar el vial; volvió a enjuagar al tubo cónico de 50 ml. Se tapó herméticamente y se agitó suavemente para lavar las células.
- 15 7.4.15 Se centrifuga a 400 x g durante 5 min a temperatura ambiente.
- 7.4.16 Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de CM2/IL-2 caliente usando una punta de pipeta de 1000 µl. Alternativamente, antes de agregar el medio, se resuspendió el sedimento celular arrastrando el tubo tapado a lo largo de una gradilla de tubos vacía. Después de resuspender el sedimento celular, se llevó el volumen a 4 ml usando medio CM2/IL-2. Volumen grabado.
- 20 7.4.17 Se eliminó una pequeña alícuota (por ejemplo, 100 µl) para el recuento celular usando un contador celular automatizado.
- 7.4.17.1 Recuentos realizados por duplicado de acuerdo con el POE del contador celular automatizado particular. Lo más probable es que fuera necesario realizar una dilución de las PBMC antes de realizar los recuentos de células. Una dilución inicial recomendada era 1:10, pero variaba según el tipo de contador de células utilizado.
- 25 7.4.17.2 Registrados los recuentos.
- 7.4.18 Concentración ajustada de PBMC a 1.3×10^7 células/ml según la hoja de trabajo en la etapa 7.4.15.2 usando medio CM2/IL-2. Mezclar bien agitando suavemente o aspirando suavemente hacia arriba y hacia abajo con una pipeta serológica.
- 30 Configurar matraces de cultivo
- 7.4.19 Se devolvieron dos matraces T25 etiquetados a la BSC desde la incubadora de cultivo de tejidos.
- 7.4.20 Se devolvió el vial de 10 µg/ml de anti-CD3/OKT3 a la BSC.
- 7.4.21 Se agregó 1 ml de la suspensión de células de PBMC 1.3×10^7 a cada matraz.
- 7.4.22 Se agregaron 60 µl de anti-CD3/OKT3 de 10 µg/ml a cada matraz.
- 35 7.4.23 Se devolvieron los matraces tapados a las incubadoras de cultivo de tejidos durante 14 días de crecimiento sin alteraciones.
- 7.4.24 Se volvió a colocar el vial de anti-CD3/OKT3 en el refrigerador hasta necesitarse para el siguiente lote.
- 7.4.25 Se repitieron las etapas 7.4.9 - 7.4.24 para cada lote de PBMC a evaluar.
- Día 14, Medición de la no proliferación de PBMC
- 40 7.4.26 Trabajando con cada lote de forma independiente, se devolvieron cuidadosamente los matraces T25 duplicados a la BSC.
- 7.4.27 Para cada matraz, utilizando una pipeta serológica nueva de 10 ml, se extrajo ~17 ml de cada uno de los matraces y, más adelante, se extrajo con cuidado el medio restante para medir el volumen restante en los matraces. Volumen registrado.
- 45 7.4.28 Muestra bien mezclada pipeteando hacia arriba y hacia abajo usando la misma pipeta serológica.
- 7.4.29 Se extrajo una muestra de 200 µl de cada matraz para el recuento.

7.4.30 Células contadas usando un contador de células automatizado.

7.4.31 Se repitieron las etapas 7.4.26 - 7.4.31 para cada lote de PBMC que se evalúa.

RESULTADOS Y CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Resultados

- 5 10.1.1 Se esperaba que la dosis de irradiación gamma fuera suficiente para hacer que la replicación de las células alimentadoras fuera incompetente. Se esperaba que todos los lotes cumplieran con el criterio de evaluación, que demostró una reducción en el número total viable de células alimentadoras restantes en el día 14 del cultivo de REP en comparación con el día 0.

Criterio de aceptación

- 10 10.2.1 Se cumplieron los siguientes criterios de aceptación para cada lote de PBMC donante irradiado analizado:

10.2.2 "Sin crecimiento" - significaba que el número total de células viables el día 14 era menor que el número de células viables inicial puesto en cultivo el día 0 del REP.

- 15 10.2.3 Si un lote no cumple con el criterio anterior, el lote se volvió a analizar según el Procedimiento de prueba de contingencia descrito en la sección 10.4.

10.2.4 Después de repetir la prueba de un lote fallido, se excluyó cualquier lote de alimentadoras de MNC que no cumpliera con el criterio de aceptación tanto en la evaluación original como en la prueba de contingencia.

Pruebas de contingencia de lotes de PBMC que no cumplen con el criterio de aceptación.

- 20 10.4.1 En el caso de que un lote de PBMC de un donante irradiado no cumpliera con el criterio de aceptación anterior, se tomaron las siguientes etapas para volver a analizar el lote y descartar un error simple del experimentador como la causa de su falla.

10.4.2 Si quedaban dos o más viales satélite del lote, el lote se volvió a analizar. Si hay uno o ningún vial satélite restante del lote, entonces el lote falló de acuerdo con el criterio de aceptación de la sección 10.2 anterior.

- 25 10.4.3 Siempre que fuera posible, dos personas capacitadas (preferiblemente incluida la persona original que evaluó el lote en cuestión) realizaron las pruebas de los dos viales separados de forma independiente. Este fue el procedimiento preferido de prueba de contingencia. Aparte de los viales separados de PBMC, ambos miembros del personal podrían utilizar los mismos reactivos.

10.4.3.1. Si no había dos miembros del personal disponibles, una persona realizaba la prueba de los dos viales de PBMC para el lote fallido, trabajando con cada vial de forma independiente.

- 30 10.4.4 Se repitió la sección 7.4 "Protocolo experimental" para reevaluar el lote en cuestión.

10.4.5 Además del lote en cuestión, cada persona que realizaba las pruebas de contingencia probó un lote de control.

10.4.5.1 Si dos miembros del personal realizan pruebas de contingencia, ambos miembros del personal probaron el lote de control de forma independiente.

- 35 10.4.5.2 Si solo hay una persona disponible para realizar las pruebas de contingencia, no es necesario que el lote de control se ejecute por duplicado.

10.4.5.3 Para ser calificado, un lote de PBMC que pasa por pruebas de contingencia tenía el lote de control y ambas réplicas del lote en cuestión lograron que pasara el criterio de aceptación de la Sección 10.2.

- 40 10.4.5.4 Una vez cumplido este criterio, el lote se entregó para uso de CMO como se describe en la sección 10.2.

EJEMPLO 15: CITÓMETRO DE IMAGEN CONTADOR CELULAR AUTOMÁTICO CELLOMETER IC2

Este ejemplo describe el procedimiento para el funcionamiento del contador celular automático del citómetro de imagen Cellometer K2.

1. Definiciones

- 45 µl: microlitro

AOPI: yoduro de propidio de naranja acridina

BSC: Cabina de seguridad biológica

DPBS: solución salina con pH regulado con fosfato de Dulbecco

ml: mililitro

5 MNC: células sanguíneas mononucleares

NA: No aplica

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

EPI: equipo de protección personal

Pre-REP: cultivo TIL inicial antes del Protocolo de expansión rápida del cultivo

10 REP: Protocolo de expansión rápida

TIL: linfocitos infiltrantes de tumores

7. Procedimiento

7.1 Preparación de la suspensión celular

7.1.1 Preparación de azul de tripán

15 La concentración final de azul de tripán fue del 0.1%. El fabricante recomendó preparar una solución madre al 0.2%.

7.1.1.1 Cuando utilice azul tripán en el Cellometer K2, diluir la solución madre (0.4%) con PBS al 0.2%.

7.1.1.2 Se filtró el azul tripán con un filtro de 0.2 a 0.4 micrones y se colocaron alícuotas en pequeños volúmenes en tubos con tapa y etiquetados.

20 7.1.1.3 Se mezcló la suspensión celular a 1:1 con azul tripán al 0.2%.

7.1.2 Preparación de AOPI

7.1.2.1 Al usar AOPI en el Cellometer K2, se obtuvo la solución de AOPI.

7.1.2.2 Muestra de células teñidas a 1: 1 con solución de AOPI.

25 NOTA: Al contar cultivos de alta concentración, diluir las muestras de células en medio de cultivo celular antes de la dilución final 1:1 con azul de tripán o AOPI. Se utilizó el intervalo de recuento sugerido por el fabricante para determinar la mejor dilución a utilizar.

7.2 Configuración del Cellometer K2

7.2.1 Encendido del equipo Cellometer K2.

7.2.2 Se seleccionó el icono Citómetro de imagen de Cellometer en el monitor de ordenador asociado.

30 7.2.3 En la pantalla principal del software, seleccionar uno de los ensayos enumerados en el cuadro desplegable.

7.2.3.1 Al seleccionar el ensayo apropiado, el tipo de célula y el modo de imagen se autocompletan.

7.2.3.2 En la sección "Muestra", se hizo clic en Establecer ID de usuario/muestra para abrir otra pantalla para ingresar la información del operador para la muestra.

35 7.2.3.2.1 Ingresó de "ID de usuario". Consistirá en las iniciales de tres letras del usuario.

7.2.3.2.2 Ingresó de "ID de muestra". La identificación de la muestra se deriva de la información de la muestra entrante.

7.2.3.3 Configurar los parámetros de dilución.

7.2.3.3.1 Si no se hizo ninguna otra dilución además de la mezcla 1: 1, el factor de dilución fue 2.

7.2.3.3.2 Si se hizo una dilución antes de la mezcla final 1: 1, el factor de dilución fue 2 veces mayor que la dilución anterior.

7.2.3.3.3 Factor de dilución actualizado según la mezcla utilizada en la sección de dilución de la pantalla. Se hizo clic en el icono del lápiz para que aparecieran las pantallas de diálogo.

5 7.2.3.3.4 Se verificó que las secciones Imagen F1 e Imagen F2 son idénticas entre sí.

7.2.3.3.5 Se hizo clic en el botón "Guardar" después de que se hubiera completado la configuración.

7.3 Recuento de células

7.3.1 Se quito el respaldo de plástico de ambos lados de un portaobjetos de la cámara de recuento del Cellometer (SD100) y se colocó sobre una toallita limpia que no suelte pelusa.

10 7.3.2 Después de preparar la suspensión celular, se extrajo una pequeña alícuota de la muestra y se transfirió a un pocillo de una placa o tubo de cultivo celular multipocillo.

7.3.3 Si se diluye la muestra, se realizó la dilución con medio de cultivo celular.

7.3.4 Se agregaron 20 l11 de suspensión celular en un pocillo de la placa o tubo de cultivo celular multipocillo.

15 7.3.5 Se agregaron 20 l11 de azul de tripán al 0.2% o la solución de AOPI a la suspensión celular 20111 y se mezcló la muestra a fondo.

7.3.6 Se midieron 20 lA de la solución 1:1 y se transfirieron a un lado de la cámara de recuento.

NOTA: Evitar tocar el área despejada de la diapositiva.

7.3.7 Si es necesario, repetir la muestra en el otro lado del portaobjetos. 7.3.8. Se insertó la cámara en la ranura en la parte frontal del Cellometer.

20 7.3.8 Para el recuento de células AOPI, se hizo clic en "Vista previa F1" en la pantalla principal para obtener una vista previa de la imagen verde fluorescente (célula viva). Para el recuento de azul tripán, se hizo clic en "Vista previa Brightfield".

7.3.9 Usando la rueda de enfoque, se llevó la imagen a un enfoque óptimo. Las células tenían un centro brillante y un borde claramente definido.

25 7.3.10 Se hizo clic en "Contar" para comenzar el procedimiento de recuento.

7.3.11 Los resultados se mostraron en un cuadro emergente de resultados de recuento en la pantalla de el ordenador que mostraba los resultados del procedimiento de recuento.

EJEMPLO 16: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE IL-2 (CELLGENIX)

30 Este ejemplo describe el procedimiento de disolución de interleucina-2 humana recombinante liofilizada purificada en muestras de solución madre adecuadas para su uso en protocolos de cultivo de tejidos adicionales, incluidos todos los descritos en la presente solicitud y los ejemplos, incluidos los que implican el uso de rhIL-2.

3. Definiciones/Abreviaturas

µL: microlitro

35 BSC: Cabina de seguridad biológica

BSL2: Nivel de bioseguridad 2

D-PBS: solución salina con pH regulado con fosfato de Dulbecco

G: calibre

GMP: Buenas prácticas de manufactura

40 HAc: ácido acético

HSA: Albúmina de suero humano

mL: mililitro

NA: No aplica

EPI: equipo de protección personal

rhIL-2; IL-2: Interleucina-2 humana recombinante

COA: Certificado de análisis

5 6. Procedimiento

6.1 Preparar una solución de ácido acético al 0.2% (HAc).

6.1.1 Se transfirieron 29 ml de agua estéril a un tubo cónico de 50 ml.

6.1.2 Se agregó 1 ml de ácido acético de IN al tubo cónico de 50 ml.

6.1.3 Se mezcló bien invirtiendo el tubo 2-3 veces.

10 6.1.4 Se esterilizó la solución de HAc mediante filtración con un filtro Steriflip.

6.1.5 Tapar, fechar y etiquetar la solución "Solución estéril de ácido acético al 0.2%".

6.1.6 La solución caducó a los 2 meses. Almacenada a temperatura ambiente.

6.2 Preparar HSA al 1% en PBS.

15 6.2.1 Se agregaron 4 ml de solución madre de HSA al 25% a 96 ml de PBS en una unidad de filtro estéril de 150 ml.

6.2.2 Solución filtrada.

6.2.3 Tapar, fechar y etiquetar la solución "HSA al 1% en PBS".

6.2.4 La solución caducó a los 2 meses. Conservar a 4°C.

6.3 Por cada vial de rhIL-2 preparado, completar los formularios.

20 6.4 Solución madre de rhIL-2 preparada (concentración final de 6×10^6 UI/ml)

6.4.1 Cada lote de rhIL-2 era diferente y la información requerida se encontraba en el Certificado de análisis (COA) del fabricante, como:

6.4.1.1 Masa de rhIL-2 por vial (mg)

6.4.1.2 Actividad específica de rhIL-2 (UI/mg)

25 6.4.1.3 Volumen de reconstitución recomendado de HAc al 0.2% (ml)

6.4.2 Se calculó el volumen de HSA al 1% requerido para el lote de rhIL-2 utilizando la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\text{Masa de vial (mg)} \times \text{Actividad Biológica} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - \text{HAc vol (mL)} = 1\% \text{ HSA vol (mL)}$$

6.4.2.1 Por ejemplo, según el COA rhIL-2 lote 10200121 de CellGenix, la actividad específica para el vial de 1 mg es de 25×10^6 IU/mg. Se recomienda reconstituir el rhIL-2 en 2 ml de HAc al 0.2%.

$$\left(\frac{1 \text{ mg} \times 25 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mg}}}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - 2 \text{ mL} = 2.167 \text{ mL HSA}$$

30

6.4.3 Tapón de goma limpiado del vial de IL-2 con una toallita con alcohol.

6.4.4 Con una aguja de 16G conectada a una jeringa de 3 ml, inyectar el volumen recomendado de 0.2% de HAc en el vial. Tener cuidado de no sacar el tapón al retirar la aguja.

6.4.5 Vial invertido 3 veces y agitado hasta que todo el polvo se disuelva.

6.4.6 Se retiró con cuidado el tapón y se dejó a un lado sobre una toallita con alcohol.

6.4.7 Se agregó el volumen calculado de HSA al 1% al vial.

6.4.8 Tapar el vial con el tapón de goma.

6.5 Almacenamiento de solución de rhIL-2

5 6.5.1 Para almacenamiento a corto plazo (<72 horas), vial almacenado a 4°C.

6.5.2 Para almacenamiento a largo plazo (> 72 horas), el vial se dividió en alícuotas en volúmenes más pequeños y se almacenó en crioviales a -20°C hasta que estar listo para usar. Ciclos de congelación/descongelación evitados. Caducó 6 meses después de la fecha de preparación.

10 6.5.3 Las etiquetas de Rh-IL-2 incluyeron el número de proveedor y de catálogo, el número de lote, la fecha de vencimiento, las iniciales del operador, la concentración y el volumen de la alícuota.

EJEMPLO 17: PREPARACIÓN DE MEDIOS PARA PROCEDIMIENTOS PRE-REP Y REP

15 Este ejemplo describe el procedimiento para la preparación de medios de cultivo de tejidos para su uso en protocolos que implican el cultivo de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) derivados de varios tipos de tumores que incluyen, entre otros, melanoma metastásico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. (HNSCC), carcinoma de ovario, carcinoma de mama triple negativo y adenocarcinoma de pulmón. Este medio puede usarse para la preparación de cualquiera de los TIL descritos en la presente solicitud y en los Ejemplos.

3. Definición

µg: microgramo

µm: micrómetro

20 µM: micromolar

AIM-V®: medio de cultivo de tejidos sin suero (Thermo Fisher Scientific)

BSC: Cabina de seguridad biológica

CM1: Medio completo No.1

CM2: Medio completo No.2

25 CM3: Medio completo No.3

CM4: Medio completo No.4

IU o U: Unidades internacionales

ml: mililitro

mM: milimolar

30 NA: no aplica

EPI: equipo de protección personal

Pre-REP: procedimiento de expansión rápida previa

REP: Procedimiento de expansión rápida

rhIL-2, IL-2: interleucina-2 humana recombinante

35 RPMI1640: Medio del Roswell Park Memorial Institute, formulación 1640

POE: procedimiento operativo estándar

TIL: linfocitos infiltrantes de tumores

7. Procedimiento

7. Procedure

40 7.1 Todos los procedimientos se realizan utilizando una técnica estéril en una BSC (Clase II, Tipo A2).

7.1.1 Rociar la superficie de la campana con etanol al 70% antes de su uso.

7.1.2 Rociar todos los elementos y reactivos con etanol al 70% antes de colocarlos en la campana de cultivo de tejidos.

7.2 Alícuota de L-glutamina 200 mM

5 7.2.1 Se suministró L-glutamina en volúmenes mayores que los necesarios para la preparación de suero (por ejemplo, volúmenes de 100 ml o 500 ml).

7.2.2 Botella descongelada de L-glutamina en baño de agua a 37°C.

7.2.3 Mezclar bien L-glutamina después de descongelar, ya que precipita después de descongelar. Se aseguró de que todos los precipitados hubieran vuelto a la solución antes de la alícuota.

10 7.2.4 Colocar alícuotas de 5-10 ml de L-glutamina en tubos cónicos estériles de 15 ml.

7.2.5 Tubos etiquetados con concentración, proveedor, número de lote, fecha de alícuota y fecha de vencimiento.

7.2.6 Más adelante, los tubos se almacenaron a -20°C y se extrajeron según fuera necesario para la preparación del medio.

15 7.3 Preparación de CM1

7.3.1 Se sacaron los siguientes reactivos del almacenamiento en frío y se calentaron en un baño de agua a 37°C:

7.3.1.1 RPMI1640

7.3.1.2 Suero AB humano

20 7.3.1.3 L-glutamina 200 mM

7.3.2 Se retiró el BME del almacenamiento a 4°C y se colocó en una campana de cultivo de tejidos.

7.3.3 Se colocó la solución madre de gentamicina almacenada a temperatura ambiente en una campana de cultivo de tejidos.

25 7.3.4 Se preparó el medio CM1 de acuerdo con la Tabla 23 más adelante, agregando cada uno de los ingredientes en la sección superior de una unidad de filtro de 0.2 µm apropiado para el volumen a filtrar.

TABLA 23. Preparación de CM1

Ingrediente	Concentración final	Volumen final 500 ml	Volumen final IL
RPMI1640	NA	450 ml	900 ml
Suero AB humano, desactivado al calor 10%	50 ml	100 ml	
200mM L-glutamina	2 mM	5 ml	10 ml
55mM BME	55 µM	0.5 ml	1 ml
50mg/ml sulfato de gentamicina	50 µg/ml	0.5 ml	1 ml

30 7.3.5 Se etiquetó el matraz del medio CM1 con su nombre, las iniciales del preparador, la fecha en que se filtró/preparó, la fecha de vencimiento de dos semanas y se almacenó a 4°C hasta que fuera necesario para el cultivo de tejidos. Los medios se pueden dividir en alícuotas en botellas de menor volumen según fuera necesario.

7.3.6 Cualquier RPMI1640 restante, suero AB humano o L-glutamina se almacenó a 4°C hasta la siguiente preparación del medio.

7.3.7 La botella de reserva de BME se volvió a almacenar a 4°C.

7.3.8 La botella de reserva de gentamicina se devolvió a su ubicación adecuada de almacenamiento a temperatura ambiente.

5 7.3.9 Debido a la limitada capacidad amortiguadora del medio, el CM1 se descartó no más de dos semanas después de la preparación, o cuando el indicador de pH con rojo fenol mostró un cambio extremo en el pH (coloración de rojo brillante a rosa).

7.3.10 El día de uso, precalentar la cantidad requerida de CM1 en un baño de agua a 37°C y agregar 6000 UI/ml de IL-2.

7.3.11 Suplementación adicional, según fuera necesario

7.3.11.1 CM1 suplementado con GlutaMAX®

10 7.3.11.1.1 CM1 podría prepararse sustituyendo 2 mM GlutaMAX™ por 2 mM de glutamina (concentración final, véase la Tabla 2.) Si se hizo esto, se etiquetaron la botella de medio como en la etapa 7.3.5 anterior agregando "2 mM GlutaMAX" para evitar confusiones con la formulación estándar de CM1.

7.3.11.2 CM1 suplementado con antibiótico/antimicótico adicional

15 7.3.11.2.1 Algunas formulaciones de CM1 requieren antibióticos o antimicóticos adicionales para evitar la contaminación de TIL pre-REP que crecen a partir de ciertos tipos de tumores.

7.3.11.2.2 Se agregó antibiótico/antimicótico a las concentraciones finales que se mostraron en la Tabla 24 más adelante.

7.3.11.2.3 Si se hizo esto, se etiquetó el matraz del medio como en la etapa 7.3.1 anterior agregando el nombre o los nombres del antibiótico/antimicótico adicional para evitar confusión con la formulación estándar de CM1.

20 TABLA 24. Suplementación adicional de CM1, según fuera necesario.

Suplemento	Concentración de solución madre	Dilución	Concentración final
GlutaMAX™	200mM	1:100	2mM
Penicilina/ estreptomina	10,000 U/ml penicilina 10,000µg/ml estreptomina	1:100	100 U/ml penicilina 100 µg/ml estreptomina
Anfotericina B	250µg/ml	1:100	2.5µg/ml

7.4 Preparación de CM2

7.4.1 Retirar el CM1 preparado del refrigerador o preparar CM1 fresco como se indica en la Sección 7.3 anterior.

7.4.2 Retirado AIM-V® del refrigerador.

25 7.4.3 Se preparó la cantidad de CM2 necesaria mezclando el CM1 preparado con un volumen igual de AIM-V® en una botella de medio estéril.

7.4.4 Se agregaron 3000 UI/ml de IL-2 al medio CM2 el día de su uso.

7.4.5 Se preparó una cantidad suficiente de CM2 con 3000 UI/ml de IL-2 el día de su uso.

30 7.4.6 Se etiquetó la botella de medio CM2 con su nombre, las iniciales del preparador, la fecha en que se filtró/preparó, la fecha de vencimiento de dos semanas y almacénala a 4°C hasta que se necesite para el cultivo de tejidos. Los medios se dividieron en alícuotas en botellas de volumen más pequeño según se requirió.

7.4.7 Se devolvió cualquier CM2 sin IL-2 al refrigerador donde se puede almacenar hasta por dos semanas, o hasta que el indicador de pH rojo fenol muestre un cambio extremo en el pH (coloración de rojo brillante a rosa).

7.5 Preparación de CM3

35 7.5.1 Se preparó CM3 el día en que se requirió su uso.

7.5.2 CM3 era el mismo que el medio AIM-V®, suplementado con 3000 UI/ml de IL-2 el día de su uso.

7.5.3 Se preparó una cantidad de CM3 suficiente para las necesidades experimentales agregando la solución madre de IL-2 directamente a la botella o bolsa de AIM-V. Se mezcló bien con una suave agitación. Se etiquetaron el matraz con "3000 UI/ml de IL-2" inmediatamente después de agregarlo al AIM-V. Si hubo exceso

de CM3, guárdelo en matraces a 4°C etiquetados con el nombre del medio, las iniciales del preparador, la fecha en que se preparó el medio y su fecha de caducidad (7 días después de la preparación).

7.5.4 Medios desechados suplementados con IL-2 después de 7 días de almacenamiento a 4°C.

7.6 Preparación de CM4

5 7.6.1 CM4 era igual que CM3, con el suplemento adicional de GlutaMAX™ 2 mM (concentración final).

7.6.1.1 Por cada 1 litro de CM3, se agregaron 10 ml de GlutaMAX™ 200 mM.

7.6.2 Se preparó una cantidad de CM4 suficiente para las necesidades experimentales agregando solución madre de IL-2 y solución madre de GlutaMAX™ directamente a la botella o bolsa de AIM-V. Se mezcló bien con una suave agitación.

10 7.6.3 Matraz etiquetado con "3000 IL/nil de IL-2 y GlutaMAX" inmediatamente después de agregarlo al AIM-V.

7.6.4 Si hubo exceso de CM4, guardar en botellas a 4°C etiquetadas con el nombre del medio, "GlutaMAX", las iniciales del preparador, la fecha en que se preparó el medio y su fecha de caducidad (7 días después de la preparación).

7.6.5 Medios desechados suplementados con IL-2 después de 7 días de almacenamiento a 4°C.

15 **EJEMPLO 18: TINCIÓN SUPERFICIAL CON ANTÍGENO DE POST REP TIL**

1. PROPÓSITO

El ejemplo describe el procedimiento para la tinción de la superficie celular de post-REP TIL mediante citometría de flujo. Este procedimiento se puede aplicar a cualquier TIL descrito en la aplicación y los Ejemplos.

TÉRMINOS Y DEFINICIONES CLAVE

20 α: Alfa

β: Beta

μl: Microlitro

APC: Alofococianina

Ax647: Alex Fluor 647

25 BD: Becton Dickinson Company

BSA: Albúmina de suero bovino

BSC: Cabina de seguridad biológica

BV421: Violeta brillante 421

CD: Clúster de diferenciación

30 CST: configuración y seguimiento del citómetro

Cy: cianina

DPBS: Solución salina con pH regulado con fosfato de Dulbecco

FACS: Clasificador de células activado por fluorescencia

FBS: Suero fetal bovino

35 FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FMO: Fluorescencia menos uno

G: gramo

H7: Análogo de Cy7

ml: mililitro

PE: Ficoeritrina

PerCP-Cy5.5: Proteínas peridina-clorofila

EPI: Equipo de protección personal

REP: Protocolo de expansión rápida

5 SIT: Tubo de inyección de muestra

TCR: Receptor de células T

p/v: peso a volumen

Anticuerpos y tinciones de citometría de flujo

TABLA 25: ThermoFisher de tinción de agua viva/muerta, catálogo n.o L34966.

Diana	Formato	Clon	Proveedor	Número de catálogo
TCRab (es decir, TCR α/β)	PE/Cy7	IP26	BioLegend	306720
CD57	PerCP-Cy5.5	HNK-1	BioLegend	359622
CD28	PE	CD28.2	BioLegend	302908
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048-42
CD27	APC-H7	M-T271	BD Biosciences	560222
CD56	APC	N901	Beckman Coulter	IM2474U
CD8a	PB	RPA-T8	BioLegend	301033
CD45R A	PE-Cy7	HI100	BD Biosciences	560675
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	BioLegend	301032
CCR7	PE	150503	BD Biosciences	560765
CD3	APC/Cy7	HIT3a	BioLegend	300318
CD38	APC	HB-7	BioLegend	356606
HLA-DR	PB	L243	BioLegend	307633
CD69	PE-Cy7	FN50	BD Biosciences	557745
TIGIT	PE	MBSA43	eBioscience	12-9500-42
KLRG1	Ax647	SA231A2	BioLegend	367704
CD154	BV421	TRAP1	BD Biosciences	563886
CD137	PE/Cy7	4B4-1	BioLegend	309818
Lag3	PE	3DS223H	eBioscience	12-2239-42
PD1	APC	EH12.2H 7	BioLegend	329908
Tim-3	BV421	F38-2E2	BioLegend	345008

10

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Preparación de reactivos

7.1.1 Regulador de pH de lavado FACS

7.1.1.1 Se agregó FBS inactivado por calor al 2% (p/v) a DPBS (se agregaron 10 ml de FBS a 490 ml de IX dPBS).

7.1.1.2 Se agregó NaN_3 al 0.1% (p/v) (botella de 76,9 μl a 500 ml).

7.1.1.3 La solución se almacenó a 40°C. Desechar después de 30 días.

5 7.1.2 Tinte de agua

7.1.2.1 Se agregaron 50 μl de DMSO al vial de colorante reactivo.

7.1.2.2 Mezclar bien y confirmar visualmente que todo el tinte se hubiera disuelto.

7.1.2.3 El tinte que no se utilizó para el procedimiento se dividió en alícuotas y se congeló a 20°C hasta el siguiente uso. No se congeló/descongeló por segunda vez.

10 7.1.3 Preparación del cóctel de anticuerpos.

7.1.3.1 Los cócteles se prepararon en tubos de polipropileno como un tubo Eppendorf

7.1.3.2 Los cócteles se almacenaron hasta por 6 meses.

Tabla 26: Panel de diferenciación 1 (DF1):

Diana	Formato	Clon	Proveedor	Número de catálogo	Título
TCRab (es decir, TCR α/β)	PE/Cy7	IP26	BioLegend	306720	3
CD57*	PerCP-Cy5.5	HNK-1	BioLegend	359622	2
CD28*	PE	CD28.2	BioLegend	302908	2
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048.42	2
CD27*	APC-H7	M-T271	BD Biosciences	560222	3
CD56	APC	N901	Beckman Coulter	IM2474U	3
CD8a	PB	RPA-T8	BioLegend	301033	2
Regulador de pH FACS					33

15

Tabla 27: Panel de diferenciación 2 (DF2):

Diana	Formato	Clon	Proveedor	Número de catálogo	Título
CD45RA*	PE-Cy7	HI100	BD Biosciences	560675	1
CCD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	BD Biosciences	552852	2
CCCR7*	PE	150503	BD Biosciences	560765	5
CCD8	FITC	HIT8	BioLegend	300906	2

ES 3 008 832 T3

CCD4	APC/Cy7	OKT4	BioLegend	317418	2
CCD38*	APC	HB-7	BioLegend	356606	1
HLA-DR	PB	L243	BioLegend	307633	2
Regulador de pH FACS					35

Tabla 28: Panel de activación de células T (Tact 1)

Diana	Formato	Clon	Proveedor	Número de catálogo	Título
CD137*	PE/Cy7	4B4-1	BioLegend	309818	2
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	BD Biosciences	552852	2
Lag23*	PE	3DS223H	eBioscience	12-2239-42	5
CD8	FITC	HIT8	BioLegend	300906	2
CD4	APC/Cy7	OKT4	BioLegend	317418	2
PD1*	APC	EH12.2H7	BioLegend	329908	2
Tim-3*	BV421	F38-2E2	BioLegend	345008	2
Regulador de pH FACS					33

Tabla 29: Panel de activación de células T (Tact 2)

Diana	Formato	Clon	Proveedor	Número de catálogo	Título
CD69*	PE-Cy7	FN50	BD Biosciences	557745	3
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	BD Biosciences	552852	2
TIGIT*	PE	MBSA43	eBioscience	12-9500-42	3
CD8	FITC	HIT8	BioLegend	300906	2
CD4	APCCy7	OKT4	BioLegend	317418	2
KLRG1*	APCCy7	SA231A2	BioLegend	367704	1
CD154*	Ax647	TRAP1	BD Biosciences	563886	3
Regulador de pH FACS					34

5

7.2 Requisitos del ensayo de citometría de flujo

7.2.1 Calibración del citómetro de flujo

- 7.2.1.1 El citómetro de flujo se calibró el día del ensayo utilizando perlas de CST siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 7.2.1.2 El operador se aseguró de que el citómetro de flujo hubiera pasado la calibración, donde las comprobaciones de rendimiento y de referencia son válidas.
- 5 7.2.2 Controles de compensación/FMO
- 7.2.2.1 Se prepararon muestras de compensación de un solo color utilizando las perlas de compensación BD y el kit de perlas de compensación reactiva de amina ArCTM.
- 7.2.2.2 Control de FMO, las muestras que contienen células se tiñeron con un cóctel de anticuerpos menos el siguiente conjugado de anticuerpo único, CD27, CD28 y CD57.
- 10 7.2.3 Estandarización de IMF
- 7.2.3.1 Los voltajes del citómetro se determinaron diariamente con un control de perlas y valores de voltaje objetivo.
- 7.3 Tinción de la muestra
- 7.3.1 Tubo FACS etiquetado con la muestra ID-DF1, muestra ID-DF2, muestra ID-T1, muestra ID-T2.
- 15 7.3.2 Etiquetado un conjunto de controles FMO con CD27-APC-H7, CD28-PE, CD57-PerCPCy5.5, CD45RA-PECy7, CCR7-PE, CD38-APC, CD137-PE7, Lag3-PE, PD1 APC, Tim3-BV421, CD69-PE7, TIGIT-PE, KLRG1-Ax647, y CD154-BV421.
- 7.3.3 Se agregaron de 0.5 a 2 millones de células a cada tubo.
- 7.3.4 QS a 3 ml de 1xPBS en cada tubo.
- 20 7.3.5 Hacer girar los tubos a 400 x g, alta aceleración y frenado, durante 5 minutos.
- 7.3.6 Mientras se centrifugaban las muestras, se preparó el tinte Aqua de etiquetado de células muertas.
- 7.3.7 Se retiró una alícuota de Aqua del congelador y se diluyó 1/200 en PBS. Mantener oscuro. Se agregaron 2 ul de tinte a 198 ul de DPBS.
- 7.3.8 Se decantó o aspiró el sobrenadante de la etapa 7.3.5.
- 25 7.3.9 Se agregaron 25 ul de la solución Aqua de arriba a las muestras y controles de FMO.
- 7.3.10 Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT) en la oscuridad.
- 7.3.11 Nota: Si las células se almacenaron inicialmente en un medio libre de proteínas, se debe agregar una etapa de bloqueo, como 5 ul de TruStain durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7.3.12 Se agregaron 50 ul de cócteles de anticuerpos a los tubos correspondientes.
- 30 7.3.13 Se agitó la rejilla de tubos para mezclar.
- 7.3.14 Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 7.3.15 Registro de horas de inicio y finalización. Se agregaron 3 ml de regulador de pH de lavado FACS.
- 7.3.16 Tubos centrifugados a 400 x g, alta aceleración y frenado, durante 5 minutos.
- 7.3.17 Cuando se completó el centrifugado, se decantó o aspiró el sobrenadante.
- 35 7.3.18 Células resuspendidas deslizando los tubos a lo largo de una gradilla vacía.
- 7.3.19 Se agregaron 100 uL de paraformaldehído al 1% a cada tubo.
- 7.3.20 Almacenado a 40°C en la oscuridad hasta que estuviera listo para recolectarse en el citómetro de flujo. Nota: Las muestras se pueden almacenar hasta 72 horas.
- 7.4 Control de compensación L/D Aqua.
- 40 7.4.1 Tubos FACS etiquetados como control de compensación L/D Aqua.
- 7.4.2 Se agregó una gota de cuentas Arc al tubo.

- 7.4.3 Se agregaron 3 µl de L/D Aqua directamente a las perlas.
- 7.4.4 Se incubaron los tubos a temperatura ambiente en la oscuridad durante 10 a 30 minutos.
- 7.4.5 Tiempo de incubación inicial y final registrado en la hoja de trabajo
- 7.4.6 Después de la incubación, se agregaron 3 ml de FACS Wash a cada tubo.
- 5 7.4.7 Tubos centrifugados a 400 x g, alta aceleración y frenado, durante 5 minutos.
- 7.4.8 Decantado o aspirado el sobrenadante.
- 7.4.9 Se resuspendieron los tubos con 500 µl de solución de PFA al 1%. Se agregó 1 gota de cuenta negativa. Colocar a 40°C en oscuridad hasta su recogida.
- 7.5 Tinción de control de compensación.
- 10 7.5.1 Tubos FACS etiquetados como se mostró en la hoja de trabajo Post-REP TIL Fenotipo.
- 7.5.2 Se agregaron los anticuerpos como se mostró en la hoja de trabajo Post-REP TIL Fenotipo.
- 7.5.3 Después de la incubación, se agregaron 3 ml de regulador de pH FACS a cada tubo.
- 7.5.4 Tubos centrifugados a 500 g, alta aceleración y frenado, durante 2 minutos.
- 7.5.5 Decantado o aspirado el sobrenadante.
- 15 7.5.6 Se resuspendieron los tubos con 500 µl de PFA al 1% en PBS y se almacenaron a 2-80°C en la oscuridad.
- 7.6 Adquisición de datos
- 7.6.1 Software FACSDiva abierto e inicio de sesión.
- 7.6.2 En el cuadro de diálogo de discrepancia del citómetro, se hizo clic en "Usar configuración de CST".
- 20 7.6.3 Se creó un nuevo experimento haciendo clic en la pestaña "Experimento" y seleccionando la plantilla "Fenotipo extendido".
- 7.6.4 Se hizo doble clic en el experimento de valores objetivo y se ajustaron los voltajes para alcanzar los valores objetivo determinados por el operador del núcleo de flujo.
- 7.6.5 Copiar la configuración del instrumento y pegarla en el nuevo experimento.
- 7.6.6 Se creó un espécimen para cada individuo y se nombró apropiadamente.
- 25 7.6.7 Se crearon nombres para las muestras de acuerdo con las etiquetas de sus tubos.
- 7.6.8 Se agitó suavemente con vórtex o se movió el dedo antes de colocar el tubo en el SIT.
- 7.6.9 Adquirir los datos bajo REGISTRO en el tablero de Adquisición.
- 7.6.10 Analizar las muestras a una velocidad de menos de 7,500 eventos por segundo.
- 7.6.11 Recopilar entre 50,000 y 100,000 eventos en vivo, excluidos los escombros.
- 30 **EJEMPLO 19: PROCEDIMIENTO 2A DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO DE VERIFICACIÓN**
- Los experimentos de este ejemplo se completaron para analizar el procedimiento 2A para la fabricación de TIL a partir de tumores de melanoma derivados del paciente y un solo cáncer de mama que incluye el brote de TIL a partir de tumores en un procedimiento pre-REP, seguido de un REP modificado. Se hizo especial hincapié en el establecimiento de un producto TIL congelado y una comparación del rendimiento del producto TIL congelado con el procedimiento actual del producto TIL fresco (Procedimiento 1C). Este informe demostrará que se observan perfiles similares en la evaluación de atributos de calidad críticos frescos y descongelados (número de células, % de viabilidad, % de células T CD3+ y producción de interferón gamma estimulado por perlas (IFN-γ)), así como un procedimiento fenotípico de reestimulación extendida (reREP) si el mismo producto TIL es fresco o congelado. Los datos presentados para apoyar esta conclusión incluyen proliferación, viabilidad, fenotipo, liberación de IFN-γ, potencia, longitud de los telómeros y actividad metabólica. Los resultados caracterizan el Procedimiento 2A, un procedimiento pre-REP/REP abreviado seguido de la crioconservación de TIL y comparan el procedimiento 2A con el procedimiento 1C más largo, como se describe en el presente documento.
- 35
- 40

Las descripciones de los donantes de tumores, las fechas de tratamiento y las ubicaciones de tratamiento se pueden encontrar en la Tabla 1 más adelante (* indica que el REP se inició usando una línea de pre-REP TIL congelada):

Tabla 30: Descripción de donantes de tumores, fechas de tratamiento y ubicaciones de tratamiento.

ID de tumor ID	Tipo de tejido	Fuente	Tejido
M1061	Melanoma	MT group	Primario – pie lateral izquierdo
M1062	Melanoma	Moffitt	N/A
M1063	Melanoma	MT group	Metastásico C-ingle derecha
M1064	Melanoma	MT group	Metastásico C-tobillo izquierdo
M1065	Melanoma	Bio Options	Metastásico-Nodo linfático de axila
EP11001	ER+PR+	MT group	Primario- carcinoma ductal invasivo de mama izquierda
M1056*	Melanoma	Moffitt	N/A
M1058*	Melanoma	MT group	Metastásico- cuero cabelludo izquierdo de etapa IIB
M1023*	Melanoma	Atlantic Health	Primario- axila derecha

5

3. INFORMACIÓN DE ANTECEDENTES

3.1 LN-144 es un producto inmunoterapéutico para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico. El producto estaba compuesto por linfocitos T autólogos infiltrantes de tumores (TIL) obtenidos de un paciente individual después de la resección quirúrgica de un tumor y expandidos ex vivo mediante cultivo celular de fragmentos tumorales morcelados (pre-REP) seguido de expansión rápida de TIL en presencia de dosis altas de IL-2, anti-CD3 y APC coestimuladora. Después de un precondicionamiento por depleción linfática no mieloablativa, el paciente recibió una única infusión de su TIL y posteriores infusiones intravenosas de aldesleucina (IL-2) cada 8 horas hasta un máximo de 6 dosis. El estudio que involucra procedimientos alternativos de expansión de TIL en la configuración de moléculas de patrón molecular asociado al daño (DAMP) dentro del microambiente tumoral (TNE) también ha demostrado una expansión eficaz de las células T útiles para la terapia (Donia 2014; Somerville, 2012).

El Procedimiento 1C que se ha utilizado para la producción comercial de TIL implica un programa de producción que puede tardar entre 45 y 55 días en producir un producto de TIL infundible que se administra a un paciente inmunodeprimido en 24 horas. La inmunodepleción del paciente receptor debe sincronizarse con precisión con la recolección del producto TIL actual. Los retrasos en la recolección o la entrega del producto fresco pueden afectar negativamente a un paciente inmunodeprimido que espera la infusión. El procedimiento 2A mejoró tras el procedimiento 1C al reducir el plazo y los materiales de fabricación, debido a la reducción de la duración de los procedimientos de pre-REP y REP. Además, el Procedimiento 2A aumentó la flexibilidad para el tiempo de envío del producto. Las diferencias entre el Procedimiento 1C y el Procedimiento 2A en el pre-REP, REP y recolección del procedimiento (véase Tabla 2) incluyen:

3.1.1 Matrices más grandes con mayor capacidad de fragmentos tumorales utilizados en el procedimiento pre-REP.

3.1.2 Etapas que hicieron uso de un sistema cerrado o que son susceptibles de adaptación futura a un sistema cerrado.

3.1.3 Disminución del número de días en los procedimientos pre-REP y REP.

3.1.4 Un enfoque directo a REP, que eliminó la necesidad de fenotipar poblaciones pre-REP antes de seleccionar poblaciones específicas de pre-REP TIL para proceder a REP.

3.1.5 Un cocultivo con un número preestablecido de APC PBMC alogénicas irradiadas junto con anti-CD3 (clon OKT3) calculado para una expansión suficiente de TIL.

3.1.6 Un sistema de lavado celular automatizado para la recolección.

3.1.7 Una formulación final basada en CS10 que se conservó criogénicamente antes del envío.

Tabla 31: Impacto del procedimiento 2A en el procedimiento 1C.

Etapa de procedimiento	Procedimiento 1C	Procedimiento 2A	Impacto
ETAPA A: Obtener la muestra del tumor del paciente	• Después de la cirugía, se puede congelar después de la recolección y antes de la etapa B. • Fragmentación física • 4 fragmentos por 10 matraces de G-REX -10	• Después de la cirugía, se puede congelar después de la recolección y antes de la etapa B. • Fragmentación física • 40 fragmentos por matraz de 1 G-REX -100M	• Igual. • Aumento de fragmentos tumorales • por matraz • Tiempo de cultivo reducido
ETAPA B:			
Primera expansión	• 11-21 Día de duración • El medio de cultivo comprende IL-2 • Los TIL de la etapa B se congelan hasta que estuvieran fenotipados para la selección y luego se descongelan para continuar con la etapa D (~ día 30)	• 11 Días de duración (intervalo de 3 días a 14 días) • El medio de cultivo comprende IL-2 • Los TIL de la etapa B se mueven directamente a la etapa D en el Día 11 de la etapa B • la Etapa D requiere 25-200x10⁶ TIL	• Número reducido de etapas • Dispuesto a sistema cerrado • Procedimiento abreviado pre-REP-a-REP • Número reducido de etapas
ETAPA C: Transición de la Primera Expansión a la Segunda Expansión	• Etapa D requiere >40x10⁶ TIL • 6 matraces G-REX -100M - en la Etapa D el día 0 • 5x10⁶ TIL y 5x10⁸ células alimentadoras que presentan antígeno por matraz en la Etapa D el día 0	• 1 matraz G-REX -500M en la Etapa B el día 11 • 25-200x10⁶ TIL and 5x10⁹ células alimentadoras que presentan antígeno en la etapa B el día 11	• Selección de fenotipado eliminada • Dispuesto a sistema cerrado • Número reducido de etapas • Duración de REP más corta • Sistema cerrado transferencia de TIL entre matraces
ETAPA D: Segunda expansión	• Dividido en 18-36 matraces en la Etapa D el Día 7 • 14 Días de duración para la Etapa D	• Dividido en ≤ 6 G-REX - 500M matraces el Día 16 • 11 Días de duración para la Etapa D • El medio de cultivo comprende IL-2, OKT-3, y células presentadoras de antígeno	• Sistema cerrado intercambio de medio

Etapa de procedimiento	Procedimiento 1C	Procedimiento 2A	Impacto
	• El medio de cultivo comprende IL-2, OKT-3, y células presentadoras de antígeno		• Número reducido de etapas
ETAPA E: Recolección de TIL	• TIL recolectados mediante centrifugación	• TIL recolectados mediante sistema de lavado automatizado LOVO	• Lavado automatizado de células • Sistema cerrado • Pérdida reducida de producto durante el lavado
	• Producto fresco en Hypothermosol	• Producto crioconservado en PlasmaLyte-A + 1% HSA y CS10 almacenado en LN2	• Flexibilidad de envío
	• Bolsa de infusión individual	• Alícuotas múltiples	• Programación flexible de pacientes • Pruebas más oportunas de liberación
ETAPA F: Formulación final / Transferencia a bolsa de infusión, tiempo de procedimiento estimado total	• Estabilidad de envío limitada • 43-55 días desde la Etapa A hasta la Etapa E	• Estabilidad de envío más larga • 22 días desde la Etapa A hasta la Etapa E	• Entrega más rápida al paciente
			• Rendimiento disminuido de sala limpia • Coste disminuido de bienes

4. ABREVIATURAS

µg: microgramo

µl: microlitro

5 µm: micrómetro

APC: células presentadoras de antígeno

CD: Clúster de diferenciación

CM: memoria central

CM1, CM2: Medios de cultivo 1, 2

10 CO2: dióxido de carbono

CS10: medio de crioconservación CryoStor® CS10 (BioLife Solutions)

Ct: ciclo umbral de PCR

DAMP: moléculas de patrón molecular asociado al daño

dCt: diferencia entre el valor Ct de referencia y el valor Ct de prueba

- ddCt: diferencia entre dCt y valor de Ct estándar largo
- ECAR: tasa de acidificación extracelular (medida de glucólisis)
- EM: memoria efectora
- ER+/PR+: Receptor de estrógeno+/Receptor de progesterona+
- 5 GMP: Buenas prácticas de fabricación
- HBSS: solución salina equilibrada de Hanks
- HSA: Albúmina de suero humano
- IFN- γ : interferón gamma
- IL: interleucina
- 10 UI: unidades internacionales
- LN2: nitrógeno líquido
- MI: mililitro
- Mm: milímetro
- ND: No determinado
- 15 Ng: Nanograma
- °C: grados Celsius
- OCR: tasa de consumo de oxígeno (medida de fosforilación oxidativa)
- OKT3: designación de clon de anticuerpo monoclonal anti-CD3
- PBMC: células mononucleares de sangre periférica
- 20 PD: Desarrollo de procedimientos
- REP: Protocolo de expansión rápida
- Rh: humano recombinante
- POE: procedimiento operativo estándar
- T/S: relación de número de copias repetidas de telómeros a número de copias de un solo gen
- 25 TIL: linfocito infiltrante de tumor
- VDJ: segmentos variables, de diversidad y de unión del receptor de células T
- V α , V β : los segmentos de la región variable del receptor de células T maduras en el linfocito infiltrante de tumor predominante
- μ g: microgramo
- 30 μ l: microlitro
- μ m: micrómetro
- APC: células presentadoras de antígeno
- CD: Clúster de diferenciación
- CM: memoria central
- 35 CM1, CM2: Medios de cultivo 1, 2
- CO2: dióxido de carbono
- CS10: medio de crioconservación CryoStor® CS10 (BioLife Solutions)

Ct: ciclo umbral de PCR

DAMP: moléculas de patrón molecular asociado al daño

dCt: diferencia entre el valor Ct de referencia y el valor Ct de prueba

ddCt: diferencia entre dCt y valor de Ct estándar largo

5 ECAR: tasa de acidificación extracelular (medida de glucólisis)

EM: memoria efectora

ER+/PR+: Receptor de estrógeno+/Receptor de progesterona+

GMP: Buenas prácticas de fabricación

HBSS: solución salina equilibrada de Hanks

10 HSA: Albúmina de suero humano

IFN-γ: interferón gamma

IL: interleucina

UI: unidades internacionales

LN2: nitrógeno líquido

15 MI: mililitro

Mm: milímetro

ND: No determinado

Ng: Nanograma

°C: grados Celsius

20 OCR: tasa de consumo de oxígeno (medida de fosforilación oxidativa)

OKT3: designación de clon de anticuerpo monoclonal anti-CD3

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

PD: Desarrollo de procedimientos

REP: Protocolo de expansión rápida

25 Rh: humano recombinante

POE: procedimiento operativo estándar

T/S: relación de número de copias repetidas de telómeros a número de copias de un solo gen

TIL: linfocito infiltrante de tumor

VDJ: segmentos variables, de diversidad y de unión del receptor de células T

30 Vα, Vβ: los segmentos de la región variable del receptor de células T maduras en el linfocito infiltrante de tumor predominante

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Procedimiento 2A

5.1.1 Pre-REP: Una vez recibido, el tumor se transfirió a una cabina de seguridad biológica (Clase II, Tipo A2).
 35 Utilizando una técnica estéril, el tumor se extrae del contenedor de envío y se lava en HBSS que contiene 50 μg/ml de gentamicina. El técnico morcela el tumor en 40 fragmentos de 3X3X3 mm que se transfieren a un matraz G-REX - 100M que contiene medio CM1 precalentado suplementado con 6000 UI/ml de rhIL-2. El matraz se coloca en una incubadora de cultivo de tejidos humidificada con CO₂ al 5% a 37°C durante 11 días. Si el tumor genera más de 40 fragmentos, entonces se puede configurar más de un G-REX -100M. Más
 40 adelante, las células se recogen y se preparan para el REP.

- 5.1.2 REP: El día 11, se prepara un matraz G-REX -500M que contiene 5L de CM2 suplementado con 3000 UI/ml de rhIL-2, 30ng/mL anti-CD3 (Clon OKT3) y 5×10^9 células alimentadoras PBMC alogénicas irradiadas. Los TIL recolectados del matraz pre-REP G-REX -100M después de la reducción de volumen se cuentan y se siembran en el matraz G-REX -500M a una densidad que puede oscilar entre 5×10^6 y 200×10^6 células. Más adelante, el matraz se coloca en una incubadora humidificada de cultivo de tejidos con CO₂ al 5% a 37°C durante cinco días. El día 16, se reduce el volumen del matraz G-REX -500M, se cuentan los TIL y se determina su viabilidad. En este punto, los TIL se expanden en múltiples matraces G-REX -500M (hasta un máximo de seis matraces), cada uno con una densidad de siembra de 1×10^9 TIL/matraz. Más adelante, todos los matraces se colocan en incubadoras humidificadas de cultivo de tejidos con CO₂ al 5% a 37°C durante seis días más. El día 22, el día de la recolección, el volumen de cada matraz se reduce en un 90%, las células se agrupan y se filtran a través de un filtro de sangre de 170 µm, y luego se recogen en una bolsa Origin EV3000 de 3 l o equivalente en preparación para el lavado automático usando el LOVO.
- 5.1.3 Recolección y formulación final: se lavan los TIL utilizando el sistema de tratamiento celular automatizado LOVO que reemplaza el 99.99% de los medios de cultivo celular con un regulador de pH de lavado que consiste en PlasmaLyte-A suplementado con 1% de HSA. El LOVO opera utilizando tecnología de membrana de filtración giratoria que recupera más de 92% de los TIL al tiempo que elimina virtualmente los componentes residuales del cultivo de tejidos, incluidos el suero, los factores de crecimiento y las citocinas, así como otros desechos y partículas. Una vez completado el lavado, se realiza un recuento de células para determinar la expansión del TIL y su viabilidad tras la recolección. Se agrega CS10 al TIL lavado en una relación volumen: volumen de 1:1 para lograr la formulación final del Procedimiento 2A. El producto formulado final se divide en alícuotas en bolsas de almacenamiento criogénico, se sella y se coloca en casetes de aluminio preenfriados. Las bolsas de almacenamiento criogénico que contienen TIL se congelan luego usando un congelador de velocidad controlada CryoMed (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) de acuerdo con POE LAB-018 Rev 000 Operación del congelador de velocidad controlada.
- 5.2 Muestras de TIL: Se recolectaron cuatro condiciones de TIL para la comparación de caracterización.
- 5.2.1 TIL recién recolectados (directo de PlasmaLyte-A con regulador de pH de lavado HSA al 1%) TIL descongelados (directo de la bolsa de producto final descongelado)
- 5.2.2 ReREP TIL de fenotipo extendido fresco (TIL recién recolectado cultivado durante 7-14 días con IL-2, alimentadoras de PBMC y clon anti-CD3 OKT3)
- 5.2.3 TIL de fenotipo extendido descongelado (TIL descongelado cultivado durante 7-14 días con IL-2, alimentadoras de PBMC y clon anti-CD3 OKT3)
- 5.3 Descripción general de la prueba (véase la figura 2)
- 5.3.1 Las pruebas previas al REP incluyen la evaluación de la cantidad de IL-2 y el análisis de los metabolitos del cultivo celular como glucosa, ácido láctico, L-glutamina y amoníaco durante todo el período previo al REP.
- 5.3.1.1 Cuantificación de IL-2: el medio se extrajo periódicamente del cultivo pre-REP y se analizó mediante ELISA para la cuantificación de IL-2. Véanse las instrucciones del fabricante del kit de ELISA de IL-2 Quantikine humana de R&D Systems.
- 5.3.1.2 Análisis de metabolitos del cultivo celular: el medio se extrajo periódicamente del cultivo pre-REP y se analizó para los siguientes metabolitos: glucosa, ácido láctico, L-glutamina y amoníaco. Véase el manual del usuario de Roche Cedex Bioanalyzer para obtener instrucciones.
- 5.3.2 Las pruebas de REP incluyeron ensayos extendidos como recuentos de células, % de viabilidad, análisis de citometría de flujo de moléculas de superficie celular, potencia (producción de IFN-γ), ensayo de lisis redirigida bioluminiscente, producción de granzima B, metabolismo celular y medición de la longitud de los telómeros.
- 5.3.2.1 Recuentos celulares y viabilidad: Se contaron las muestras de TIL y se determinó la viabilidad usando un contador celular automatizado Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA) de acuerdo con POE LAB-003 Rev 000 contador de células con citómetro automático de imagen Cellometer K2.
- 5.3.2.2 Análisis de citometría de flujo de biomarcadores de superficie celular: las muestras de TIL se dividieron en alícuotas para el análisis de citometría de flujo de marcadores de superficie celular utilizando el procedimiento descrito en WRK LAB-041 Rev 000 Tinción de antígeno de superficie de Post REP TIL
- 5.3.2.3 Ensayo de potencia (producción de IFN-γ): se midió otra medida del potencial citotóxico determinando los niveles de la citocina IFN-γ en el medio de TIL estimulado con anticuerpos contra CD3, CD28 y CD137/4-1BB. Los niveles de IFN-γ en los medios de estos TIL estimulados se determinaron utilizando WRK LAB-016 Rev 000 estimulación de TIL para medir la liberación de IFN-γ

5.3.2.4 Ensayo de lisis redirigida bioluminiscente: El potencial citotóxico de TIL para lisar las células diana se evaluó mediante un ensayo de cocultivo de TIL con la línea celular bioluminiscente, P815 (clon G6), de acuerdo con el POE descrito en WRK LAB-040 Ensayo de lisis redirigido bioluminiscente (ensayo de potencia) para TIL

5 5.3.2.5 Producción de granzima B: La granzima B es otra medida de la capacidad de TIL para matar las células diana. Los sobrenadantes del medio reestimulados como se describe en 5.2.5.3 también se evaluaron para sus niveles de Granzima B usando el Kit ELISA Human Granzyme B DuoSet ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 5.3.2.6 Metabolismo celular (respiratorio): las células se trataron con inhibidores de la respiración mitocondrial y la glucólisis para determinar un perfil metabólico del TIL que consta de las siguientes medidas: fosforilación oxidativa basal (medida por OCR), capacidad respiratoria de reserva, actividad glucolítica basal (medido por ECAR) y reserva glucolítica. Los perfiles metabólicos se realizaron usando el procedimiento descrito en WRK LAB-029 Ensayo de Prueba de Estrés Mitocondrial/Glucólisis de Combinación de Seahorse.

15 5.3.2.7 Medición de la longitud de los telómeros: Se han utilizado diversos procedimientos para medir la longitud de los telómeros en preparaciones citológicas y de ADN genómico. El análisis de fragmentos de restricción de telómeros (TRF) es el estándar de oro para medir la longitud de los telómeros (de Lange et al., 1990). Sin embargo, la principal limitación de TRF es el requisito de una gran cantidad de ADN (1.5 μ g). Dos técnicas ampliamente utilizadas para la medición de la longitud de los telómeros, a saber, la hibridación fluorescente in situ (FISH; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y la PCR cuantitativa.

20 5.3.3 Se tomaron muestras adicionales para las siguientes pruebas y podrían analizarse en el futuro según fuera necesario:

5.3.3.1 Análisis de citocinas en profundidad

5.3.3.2 Secuenciación de TCR

6. RESULTADOS ALCANZADOS

25 Se realizaron un total de 9 experimentos utilizando los TIL derivados de los tumores descritos en la sección 2.3, el diseño experimental y las condiciones de recolección en la sección 5.1. Los TIL recolectados mediante el Procedimiento 2A se sometieron a las pruebas divulgadas en la sección 5.3.2 con el fin de comprender su capacidad para expandirse, su viabilidad, fenotipo, potencial citotóxico y perfil metabólico. Se tomaron todas las medidas para el producto TIL recién recolectado y el producto TIL congelado descongelado (Procedimiento 2A).

30 6.1 Recuento celular y viabilidad

35 6.1.1 Los recuentos de células se tomaron al final del pre-REP, el día 5 o 6 del REP (día de expansión) y al final del REP, tanto antes del lavado LOVO como después del lavado LOVO. Más adelante, se utilizaron los recuentos de células para determinar la expansión de TIL durante el REP y la recuperación de TIL después de lavar con LOVO. Después de la descongelación, las células se contaron nuevamente para determinar la recuperación posterior a la descongelación (basada en la concentración a la que se congelaron los TIL) y la viabilidad posterior a la descongelación antes de proceder con otro ensayo analítico. La Tabla 3 resume todos estos resultados para las nueve ejecuciones del Procedimiento 2A.

Tabla 32: Recuento de células, % de viabilidad, y expansión de TIL de las ejecuciones de procedimiento 2A.

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
Inóculo de pre-REP	3.3×10^7	1×10^8	7.5×10^7	1.6×10^8	4.1×10^8	5.4×10^8	7×10^7	4.7×10^7	4.6×10^7
Día 5/6 recuento	1.3×10^8	4×10^8	3×10^8	3.6×10^8	6.6×10^8	2.8×10^9	4.0×10^9	3.7×10^9	2.2×10^9
Expansión múltiple del día 0 a día 11	898	590	470	130	1900	522	771	1400	850
Recolección	2.8×10^{10}	5.6×10^{10}	3.5×10^{10}	2.3×10^{10}	7.8×10^9	2.63×10^{10}	5×10^{10}	6.7×10^{10}	4.1×10^{10}
Recuperación LOVO (%)	1010	68	100	100	92	85	100	90	99
Bolsas de criopreservación	$3 \times 30\text{ml}$	$2 \times 100\text{ml}$	$2 \times 100\text{ml}$	$2 \times 50\text{ml}$	$3 \times 100\text{ml}$	$2 \times 65\text{ml}$	$2 \times 100\text{ml}$	$2 \times 100\text{ml}$	$2 \times 100\text{ml}$
Recuperación pos-congelación (%)	103	84	90	88	101	82	82	86	78
Viabilidad pos-congelación (%)	84.75	84.36	77.15	83.48	79.98	74.85	80.28	85.03	89.21

6.1.2 Procedimiento 2A POE define el número inicial de TIL para un REP como un intervalo de 5200×10^6 TIL. El intervalo de nueve muestras TIL utilizadas para iniciar los REP del Procedimiento 2A fue de 4.1×10^6 (M1065T) - 1.8×10^8 (M1064T), con un número TIL inicial promedio de 6.58×10^7 . Curiosamente, el REP sembrado en placa con el número más bajo de TIL se expandió al mayor grado en la recolección de REP (intervalo de expansión para los 9 REP: 130-1900 veces; expansión promedio, 840 veces). El número medio de TIL recolectados al final de estos nueve REP del Procedimiento 2A fue 4.49×10^{10} (intervalo $7.8 \times 10^9 - 6.7 \times 10^{10}$).

6.1.3 Para obtener estadísticas comparativas del Procedimiento 1C, véase la Sección de Química, Fabricación y Controles (CMC) de la Solicitud de nuevo fármaco en investigación (IND) para LN144/LN-145.

6.1.4 El procedimiento 1C utiliza manipulación manual y centrifugación para lavar el producto TIL. Esto lleva mucho tiempo, pero lo que es más importante, puede resultar en la pérdida de hasta un 25% del producto entre la recolección y la formulación final. El sistema LOVO de lavado automático de células proporciona una manera de minimizar la pérdida de células y también introduce un sistema de lavado cerrado que disminuye el riesgo de contaminación del producto durante las etapas de lavado. La recuperación del producto que siguió a la etapa de lavado LOVO del protocolo y mostró una recuperación promedio de $93.8 \pm 10.4\%$ del producto TIL entrando en la etapa de lavado. Esta estadística incluye el producto TIL para M1062T, que tuvo una recuperación de LOVO del 68%, durante el cual un error del operador en la operación del LOVO resultó en la necesidad de centrifugar la muestra y luego reiniciar el procedimiento LOVO (véase la Sección 7, Desviaciones y discrepancias). Esto representa una mejora muy favorable con respecto a la etapa de lavado del Procedimiento 1C el día de la recolección de REP.

6.1.5 La recuperación de TIL después de la descongelación también es una preocupación importante para un producto TIL congelado. La recuperación del producto se determinó midiendo el número de células recuperadas de la bolsa después de la descongelación en comparación con el número de células colocadas en cada bolsa de congelación antes de la crioconservación. El intervalo de recuperación del deshielo fue de 78 a 103%, con una recuperación promedio de $88.2 \pm 8.6\%$.

6.1.6 Aunque existe una diferencia significativa en la viabilidad de las muestras antes o después de la descongelación, en promedio, solo hay una pérdida de viabilidad del 2% después de la descongelación. La viabilidad del TIL que entró en crioconservación fue de $84.3 \pm 4.7\%$, y la misma TIL después de la descongelación tuvo una viabilidad de $82.1 \pm 4.4\%$ ($p=0.0742$, prueba t de Student pareada, no paramétrica). Los criterios de liberación para el producto clínico TIL Procedimiento 1C fresco requieren un mínimo del 70% de viabilidad. Independientemente de una pequeña pérdida de viabilidad tras la descongelación, las 9 ejecuciones del Procedimiento 2A cumplieron este criterio de liberación después de la descongelación del producto criogénico. La Tabla 4 y la Figura 3 muestran la viabilidad del TIL que entra en crioconservación (Fresh + CS10) y la viabilidad del TIL tras la descongelación.

Tabla 33: Comparación de viabilidad de producto fresco y descongelado.

	M1061 T	M1062 T	M1063 T	M1064 T	M1065 T	EP11001 T	M1056 T	M1058T	M1023 T
Fresco + CS10	88.05	84.45	82.05	86.75	76.35	77.9	84.8	87.5	90.5
Descongelado	84.75	84.36	77.15	83.48	79.98	74.85	80.28	85.03	89.21

6.2 Expansión Re-REP de TIL. Además de examinar la capacidad del producto fresco para expandirse en un REP, se evaluó la capacidad del producto TIL fresco y descongelado para expandirse tras la reestimulación con APC alimentadoras de PBMC alogénicas irradiadas frescas y anti-CD3 fresco. Después de 7 días, estos productos TIL reestimulados se analizaron para determinar su capacidad para expandirse desde las condiciones de cultivo iniciales. La Figura 4 y la Tabla 5 muestran la expansión media de las células re-REP TIL después de 7 días de crecimiento en cultivo. El análisis de los datos utilizando una prueba emparejada t de Student muestra que la capacidad del TIL para expandirse en un re-REP no es significativamente diferente si se inicia el REP con TIL frescos o un producto TIL descongelado ($p=0.81$).

Tabla 34: Comparación de expansión de TIL frescos y descongelados en cultivo re-REP

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
Fresco	139.67	264	227	60.12	24.67	268.83	176	316.33	202.33
Descongelado	177.33	110.33	220.67	177.6	220.2	302.5	114.77	190.67	73.82

6.3 Metabolitos del cultivo celular. Una de las principales premisas de Lion 2A era que menos tiempo de tecnología y transferencias de procedimientos generarían ahorros de costes y limitarían la variabilidad. Las posibles consecuencias adversas de esto fueron el aumento de metabolitos indeseables y la disminución de las fuentes de nutrientes. Como se mostró en la Figura 5, los valores sanguíneos normales de electrolitos (sodio y potasio), nutrientes (glutamina y glucosa) y metabolitos (ácido láctico y amoníaco) proporcionan un intervalo a considerar al evaluar los resultados que salen de pre-REP del día 11. Como se mostró en la Figura 6, se evaluaron secuencialmente tres TIL (M1061T, M1062T y M1064T). En esta configuración, el potasio y el sodio se mantuvieron en niveles normales, la glucosa estaba en > 1.0 g/L y la glutamina > 0.3 mmol/L, muy por encima de los valores sanguíneos normales más bajos. Como se esperaba, el lactato se elevó hasta 0.8 g/L, alrededor de 5 veces el nivel que se encuentra en la sangre normalmente y el amoníaco hasta 3 mmol/L, como se esperaba de las células expandidas rápidamente y también sustancialmente más alto que lo que se encuentra normalmente en la sangre.

6.4 Cuantificación de IL-2.

6.4.1 El principal impulsor de la proliferación de TIL en el pre-REP, además de glucosa suplementaria, glutamina y oxigenación suficiente, es la provisión de altos niveles de rhIL-2. Después de su adición al medio que contenía suero, los niveles de IL-2 se midieron a $2-3.5 \times 10^3$ UI/ml, cayendo sólo hasta alrededor de 1.0×10^3 UI/ml durante los 11 días de cultivo. Esto está muy por encima de las 30-100 UI/ml necesarias para mantener la proliferación de células T. La evaluación de las concentraciones de IL-2 utilizando diferentes fuentes de IL-2 (Prometheus, Akron, Cellgenix) se está probando actualmente en experimentos separados (QP-17-010: Calificación de IL-2 a partir de Cellgenix, Akron y Prometheus) de Lion Biotechnologies, Tampa.

6.5 Producción de IFN- γ

6.5.1 Después de 24 horas de estimulación de TIL con Dynabeads magnéticos anti-CD3, CD28 y 4-1BB como se describe en las secciones 5.3.5.3, se recogió el sobrenadante de los cultivos y se analizó el IFN- γ usando kits de ELISA. Todos los TIL reestimulados produjeron más IFN- γ que sus contrapartes no estimuladas, lo que demuestra que la estimulación del TIL dio como resultado su activación. La Figura 8 muestra la capacidad de las cuatro composiciones de TIL diferentes (fresca, descongelada, de re-REP frescos y re-REP TIL descongelados) probadas para liberar IFN- γ en el medio circundante tras la reestimulación.

Las Tablas 6 y 7 muestran los valores medios de la secreción de IFN- γ en las 9 ejecuciones del Procedimiento 2A. La secreción de IFN- γ en el medio circundante tras la reestimulación no es diferente entre el producto TIL fresco y el TIL descongelado y crioconservado. La Tabla 6 muestra que el producto fresco produjo un promedio de 4143 ± 2285 pg IFN- γ /106 TIL mientras que el producto descongelado produjo 3910 ± 1487 pg IFN- γ /106 TIL ($p=0.55$ usando la prueba t de Student pareada). Si se normaliza al producto TIL total (Tabla 7), en promedio, el TIL fresco estimulado produjo 86 ± 61 gramos de IFN- γ , mientras que el TIL estimulado descongelado produjo 68 ± 40 gramos de IFN- γ ($p=0.13$). Estos hallazgos indican que tanto los productos TIL frescos como los descongelados producen IFN- γ y que no hay diferencia en la capacidad del TIL coincidente fresco o descongelado para producir IFN- γ tras la estimulación con anti-CD3/anti-CD28/anti-4-1BB.

Tabla 35: Secreción de IFN- γ en TIL fresco y descongelado (expresado como pg/106 células/24 horas)

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001 T	M1056T	M1058T	M1023T
Fresco	4570	3921	5589	619	1363	4263	6065	2983	7918
Descongelado	3158	3543	5478	1563	2127	5059	4216	4033	6010
Re- REP fresco	3638	1732	971	2676	2753	1461	2374	770	3512
Re- REP descongelado	2970	2060	1273	1074	1744	2522	5042	4038	923

Tabla 36: Secreción de IFN- γ en TIL fresco y descongelado. Todos los valores están en 1012 (expresados en gramos/106 células/24 horas)

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001 T	M1056T	M1058T	M1023T
Fresco	67.1	78.4	99.6	8.4	4.8	66.1	157.0	109.0	187.0

Descongelado	47.7	59.7	87.9	18.7	7.5	64.4	88.9	127.0	111.0

6.6 Producción de granzima B

- 6.6.1 Se estimularon TIL con anti-CD3, CD28 y Dynabeads 4-1BB magnéticos durante 24 horas como se describe en 5.2.5.3, y se recogió el sobrenadante de los cultivos después de 24 horas y se analizaron los niveles de Granzima B mediante ELISA. Todos los TIL reestimulados produjeron más Granzima B que sus contrapartes no estimuladas, lo que demuestra que la estimulación de TIL dio como resultado su activación. La Figura 9 muestra la capacidad del TIL fresco, la re-REP TIL fresco y la re-REP TIL descongelado para liberar Granzima B en el medio circundante tras la reestimulación con el cóctel de citocinas.
- 5
- 10 Todos los productos mostraron una producción de granzima B en el intervalo de 9190 pg/10⁶ células viables a 262000 pg/10⁶ células viables (Tabla 8). La Tabla 6 muestra que el producto fresco produjo un promedio de 60644 + 42959, mientras que el re-REP fresco y descongelado produjo 93600 + 67558 y 103878 + 84515 respectivamente. La comparación entre el re-REP fresco y el re-REP descongelado mostró que no hay diferencia en la capacidad del TIL obtenido de ninguna de las condiciones (p=0.7). Debido a la falta de medición de Granzima B en el producto descongelado, no se realizó ningún análisis estadístico utilizando el producto
- 15 TIL fresco.

Tabla 37: Secreción de granzima B en TIL fresco, reREP TIL fresco y reREP TIL descongelado (expresado como pg/10⁶ células/24 horas)

	M106 1T	M1062 T	M1063T	M1064T	M1065 T	EP110 01 T	M1056T	M1058T	M1023T
Fresco	10600	108000	49100	28400	24300	17900	120000	12900	79100
ReREP fresco	216000	37700	42400	91800	192000	22200	97300	73800	69200
ReREP descongelado	262000	113000	35100	65600	48700	9190	147000	201000	53300

6.7 Análisis de citometría de flujo de biomarcadores de superficie celular

Perfiles fenotípicos de TIL: se han estandarizado cuatro paneles de anticuerpos en LION para caracterizar ampliamente el perfil funcional de las células T. Estos paneles se utilizaron para evaluar la inmunofenotipificación de TIL fresco, TIL descongelado, Re-REP TIL fresco y Re-REP TIL descongelado. Todos los datos utilizados para la representación gráfica en esta sección también se proporcionan en formato de tabla (Tablas 14-24) en la sección 10 del apéndice.

6.8 Ensayo de lisis bioluminiscente redirigida

6.8.1 Para determinar la capacidad potencial de TIL del procedimiento 2A para matar sus células tumorales diana, desarrollamos un ensayo de potencia que implica el cocultivo de TIL con una línea celular diana sustituta bioluminiscente P815, como se describe en la sección 5.3.2.4. Un co-cultivo de 4 horas de las diferentes composiciones de TIL con P815 en presencia de estimulación anti-CD3 da una medida del potencial citotóxico de las células TIL expresadas como LU50, unidades líticas que pueden definirse como el número de TIL necesarios para matar 50% de las células diana. Esta medida se expresa luego como LU50/106 TIL. La Figura 32 más adelante muestra el potencial citotóxico del TIL del producto fresco y de las dos condiciones de re-REP TIL, re-REP fresco y re-REP descongelado.

6.8.2 La comparación del re-REP fresco con el re-REP descongelado muestra que no hay una diferencia significativa en la capacidad de cualquiera de los TIL para matar una célula diana ($p=0.3126$). Estos datos apoyan la conclusión de que no hay diferencia entre el producto fresco y descongelado en términos del potencial citotóxico del producto TIL. No se realizó ninguna comparación entre fresco ya que no se midió el potencial citotóxico inmediatamente después de descongelar TIL. La Tabla 9 muestra las unidades líticas de TIL necesarias para matar el 50% de la línea celular diana P815.

Tabla 38: Unidades líticas producidas por TIL contra la línea celular diana P815

	Fresco	ReREP fresco	ReREP descongelado
M1061T	21.7	42.3	342
M1062T	5.9	17.0	20.9
M1063T	14.2	161	12.5
M10641	22.2	8.7	4.4
M10651	42.6	411	128 8
EP11001 T	1.8	4.3	147
M1056T	25.0	16.6	18.2
M10513T	76.9	13.8	16.6
M1023T	30.8	25.6	30.4
avg $\pm$ sd	26.8 $\pm$ 22.5	20.6 $\pm$ 13.3	31.1 $\pm$ 37.6

6.9 Perfil de metabolismo celular de TIL

6.9.1 Para evaluar la salud metabólica de TIL post-REP, utilizamos los instrumentos analizadores de metabolismo de Seahorse (XFp y XFe96) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA) siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.3.2.6. Brevemente, al tratar las células con inhibidores que se dirigen a ciertos aspectos de la fosforilación oxidativa o la glucólisis, las células se estresan de tal manera que permiten la determinación de su SRC y reserva glucolítica. Además, se pueden determinar los niveles basales de fosforilación oxidativa (OCR basal) y glucólisis (ECAR basal). Finalmente, debido a que los inhibidores de la fosforilación oxidativa y la glucólisis se combinan en la misma prueba, se puede discernir una reserva oculta potencial de SRC que solo es aparente cuando las células se tratan con el inhibidor competitivo de la glucólisis, 2-desoxiglucosa (2-DG), (etiquetado como SRC2DG), lo que da como resultado un aumento de SRC que de otro modo permanecería oculto. Esta capacidad respiratoria adicional ha sido etiquetada como SRC "cubierta". La Tabla 9 muestra los perfiles metabólicos de TIL recién recolectado, Re-REP TIL fresco y Re-REP TIL descongelado derivados de la prueba de estrés metabólico realizada en las células.

6.9.2 Las Figuras 55A - F muestran los datos de la Tabla 38 en forma gráfica. El producto REP recién recolectado muestra algunas diferencias estadísticas con los productos re-REP fresco y descongelado. Esto no es sorprendente, ya que el producto re-REP se ha reestimulado con PBMC APC recién irradiado y anticuerpo anti-CD3 fresco, ya fuera inmediatamente después del REP o después de descongelarlo. Sin embargo, en todos los casos, no hay una diferencia significativa entre los productos frescos y descongelados cuando ambos se reestiman en un procedimiento de re-REP (véanse valores de p de la Tabla 9). Esto indica que el procedimiento de crioconservación no afecta negativamente al producto TIL. En particular, para la fosforilación oxidativa, los productos re-REP tienen un SRC más alto que sus productos REP de recolección fresca correspondientes. Para la glucólisis, el re-REP TIL tiene niveles basales de glucólisis estadísticamente significativamente más altos y, a la inversa, niveles estadísticamente más bajos de reserva glucolítica que el producto REP fresco. Vale la pena señalar que esto podría indicar que los Re-REP TIL están más altamente activados que los TIL recién recolectados, ya que se informa que los TIL sanos y activados poseen altos niveles de actividad glucolítica (Buck et al., JEM 212:1345-1360; 2015).

Tabla 39. Perfil metabólico del procedimiento 2A TIL.

OCR Basal, pmol/min	M1061	M1062	M1063	Mof2	Mof3	Mof4	EP11001	M1064	M1065	prom	sd	p v. fresco	p v. re REP fresco
PLLA	50.33	33.95	74.89	36.80	38.48	39.89	63.02		55.89	49.16	14.56		
Re-REP fresco	38.92	38.48	54.35	25.98	18.68	38.61	37.33	41.04		36.67	10.57	0.03	
Re-REP descongelado	39.25	43.28	60.05	30.68	57.90	59.08	27.85	52.58	32.82	44.83	12.90	0.48	0.11
SRC abierto, pmol/min													
PLLA	24.74	10.45	101.18	47.32	77.00	35.07	31.39		3.02	41.27	33.22		
Re-REP fresco	51.72	36.46	48.24	28.34	37.69	21.02	9.93	99.71		41.64	27.17	0.29	
Re-REP descongelado	47.38	40.40	121.86	26.04	37.32	86.47	58.45	89.59	56.45	62.66	30.75	0.16	0.12
SRC20G, pmol/min													
PLLA	14.01	5.72	35.98	29.97	74.62	24.42	31.39		20.70	29.60	20.67		
Re-REP fresco	81.80	78.82	52.73	38.69	92.37	42.35	-12.81	137.15		63.89	44.45	0.08	
Re-REP descongelado	76.97	77.72	177.48	48.27	56.57	69.05	74.14	130.76	85.89	88.54	40.59	0.00	0.25
SRC encubierto, pmol/min													
PLLA	0.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		17.68	2.21	6.26		
Re-REP fresco	30.08	42.36	4.50	10.35	54.68	21.33	0.00	2.63		20.74	20.13	0.02	
Re-REP descongelado	29.59	37.32	55.62	22.23	19.25	0.00	15.68	41.16	29.44	27.81	16.10	0.01	0.52
ECAR Basal, mpH/min													
PLLA	53.44	27.55	136.33	48.72	89.80	82.29	108.38		72.07	74.82	35.20		
Re-REP fresco	96.48	96.63	171.47	102.87	145.19	153.97	36.60	147.02		118.6		0.10	
Re-REP descongelado	143.35	173.93	193.39	149.19	169.21	73.17	98.64	96.37	90.55	8	43.15	0.01	0.38
Reserva glucolítica, mpH/min													
PLLA	32.11	26.18	52.00	19.09	38.01	39.03	43.14		76.43	40.76	17.61		
Re-REP fresco	24.06	8.75	16.17	-8.28	-5.89	10.31	35.34	20.80		12.91	14.85	0.003	
Re-REP descongelado	15.50	-18.94	13.56	-6.78	11.45	54.84	-21.37	-12.66	-5.47	3.35	23.75	0.01	0.47

6.9.3 Una comparación directa de productos frescos con congelados utilizando el procedimiento re-REP nos ha permitido determinar que tanto los productos TIL frescos como congelados, en condiciones de estimulación idénticas, dan como resultado perfiles metabólicos que son estadísticamente indistintos. Tanto el re-REP fresco como el re-REP TIL descongelado tienen niveles similares de respiración basal (Figura 60A, 36.7 ± 10.6 y 44.8 ± 12.9 pmol/min, respectivamente; $p=0.11$) así como SRC similar (encubierto) (Figura 60B, 41.6 ± 27.2 y 62.7 ± 30.8 ; $p=0.12$). Tras el tratamiento de estas células re-REP con 2-DG, el inhibidor competitivo de la glucosa, que da como resultado una inhibición de la glucólisis, vemos que tanto el re-REP TIL fresco como el descongelado muestran una capacidad respiratoria de reserva extra, "oculta" (SRC2DG; SRC encubierto) que es mayormente bajo o ausente en la muestra de TIL recién recolectado (Figura 60C); sólo una muestra tenía altos niveles de SRC2DG (Figura 60C) en el TIL recién recolectado, mientras que, a la inversa, sólo una de las siete muestras analizadas mostró una falta de SRC encubierto al re-REP. El SRC encubierto (Figura 60D) para re-REP fresco promedió 20.7 ± 20.1 mientras que el SRC encubierto (Figura 60D) para re-REP descongelado varió de 27.8 ± 16.1 ; $p=0.52$).

6.9.4 La lectura metabólica más sorprendente del fenotipo extendido (re-REP) TIL son los niveles consistentemente altos de glucólisis basal de las muestras de fenotipo extendido (re-REP). La glucólisis basal (Figura 60E) es consistentemente alta en las muestras de re-REP, con un promedio de 118.7 ± 44.2 mpH/min en el re-REP fresco y 132.0 ± 43.2 mpH/min en el re-REP descongelado. Estas muestras no son estadísticamente diferentes entre sí ($p=0.38$). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la muestra recién recolectada no posee niveles basales tan altos de glucólisis. En comparación con el REP TIL fresco, esta diferencia es sustancial, pero no significativa ($p=0.10$); sin embargo, en comparación con las muestras descongeladas re-REP, la diferencia es significativa ($p=0.01$). Estas células re-REP aparentemente dependen en gran medida de la glucólisis para sus necesidades energéticas, ya que tienen poca reserva glucolítica restante cuando se estresan en las pruebas metabólicas de Seahorse (Figura 60F): promedio de Re-REP TIL fresco 12.9 ± 14.9 mpH/min; Re-REP descongelado TIL, 3.35 ± 23.8 mpH/min). Estos re-REP no son diferentes entre sí ($p=0.47$) pero ambos son estadísticamente diferentes de la reserva glucolítica encontrada en muestras de TIL recolectados frescos, que promedia 40.8 ± 17.6 mpH/min ($p=0.003$ y 0.01 en comparación con las muestras frescas de TIL) REP y re-REP TIL descongelado, respectivamente). Se deben realizar más estudios para determinar la causa detrás de las diferencias observadas en la glucólisis entre estas muestras de recolección fresca y re-REP TIL.

6.10 Medición de la longitud de los telómeros

6.10.1 Medición de la longitud de los telómeros de pos-REP TIL mediante Flow Fish y qPCR.

6.10.1.1 Flow-FISH se realizó utilizando el kit Dako/Agilent Pathology Solutions (Telomere PNA Kit/FITC para citometría de flujo) y se siguieron las instrucciones del fabricante para medir la longitud promedio de la repetición del telómero. Se utilizó la línea celular de leucemia de células T 1301 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como patrón de referencia interno en cada ensayo. Se contaron los TIL individuales y se mezclaron con 1301 células en una relación de células 1:1. Se mezclaron 2×10^6 TIL con 2×10^6 1301 células. La hibridación in situ se realizó en solución de hibridación (formamida al 70%, BSA al 1%, Tris 20 mM, pH 7.0) por duplicado y en presencia y ausencia de una sonda PNA de telómero conjugada con FITC (FITC-00-CCCTAA-CCC-TAA-CCC-TAA) suplementaria a la secuencia de repetición del telómero a una concentración final de 60 nM. Después de la adición de la sonda PNA de telómero, las células se incubaron durante 10 minutos a 82°C en un bloque de calor. Más adelante, las células se colocaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. A la mañana siguiente, se eliminó el exceso de sonda de telómero lavando 2 veces durante 10 minutos cada una en un bloque de calor a 40°C con solución de lavado. Después de los lavados, se agregó DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA) a una concentración final de 75 ng/mL. La tinción de ADN con DAPI se utilizó para bloquear células en la población GO/G1. El análisis de la muestra se realizó utilizando un citómetro de flujo Yeti (PropeLabs, Fort Collins, CO). La fluorescencia del telómero de la muestra de prueba se expresó como un porcentaje de la fluorescencia (fl) de las células 1301 según la siguiente fórmula: Longitud relativa del telómero = $[(\text{células de prueba FITC fl media con sonda} - \text{células de prueba FITC fl media sin sonda}) \times \text{índice de ADN de 1301 células} \times 100] / [(\text{media de 1301 células FITC fl con sonda} - \text{media de células FITC fl 1301 sin sonda}) \times \text{índice de ADN de las células de prueba}]$.

6.10.1.2 qPCR: Se utilizó qPCR en tiempo real para medir la longitud relativa de los telómeros. Brevemente, se determinó la relación de número de copias repetidas de telómeros a número de copias de un solo gen (T/S) usando un termociclador de PCR Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en un formato de 96 pocillos. Se utilizaron diez nanogramos de ADN genómico para la reacción de PCR de telómero (Tel) o hemoglobina (hgb) y los cebadores utilizados fueron los siguientes: cebador Tel-1b (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), cebador Tel- 2b (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT), cebador hgb1 (GCTTCTGACACAAGTGTGTTCACTAGC), y cebador hgb2 (CACCAACTTCATCCACGTTCCACC). Todas las muestras se analizaron mediante las reacciones de los telómeros y la hemoglobina, y el análisis se realizó por triplicado en la misma placa. Además de las muestras de prueba, cada placa de 96 pocillos contenía una curva estándar de cinco puntos de 0.08 ng a 250 ng utilizando ADN genómico aislado de 1301 células. La relación T/S (-dCt) para cada muestra se calculó restando el valor mediano del ciclo umbral de hemoglobina (Ct) del valor mediano de Ct del telómero. La relación T/S relativa (-

ddCt) se determinó restando la relación T/S del punto de curva estándar de 10 ng de la relación T/S de cada muestra desconocida.

6.10.1.3 Resultados y discusión de la longitud de los telómeros: Los telómeros son tapas (secuencias repetitivas de nucleótidos) al final de los cromosomas lineales que desempeñan un papel fundamental para facilitar la replicación completa de los cromosomas. La medición de los telómeros es una herramienta emergente en el estudio de afecciones tales como enfermedades degenerativas, cáncer y envejecimiento. Estudios previos de los NIH (J Immunol. 2005, Nov 15;175(10):7046-52; Clin Cancer Res. 2011, Jul 1; 17(13): 4550- 4557) han demostrado que una mayor longitud de los telómeros de TIL está asociada con respuesta clínica. Por el contrario, el grupo de Radvanyi no encontró diferencias significativas en la longitud de los telómeros de TIL entre respondedores y no respondedores (Clin Cancer Res; 18 (24); 6758-70). Hasta el momento, no hay evidencia que demuestre que la longitud de los telómeros estuviera asociada con la longitud del cultivo de células T in vitro. Es posible que el post-REP TIL cultivado por el procedimiento 2A (cultivo de 22 días) tenga una longitud de telómero más larga en comparación con el TIL cultivada por el procedimiento del procedimiento 1C (cultivo de 25-36 días).

7. DISCREPANCIAS Y DESVIACIONES

7.1 Desviaciones del procedimiento

7.1.1 M1061T: Las células REP se dividieron el día 6 en 4 matraces G-Rex500M.

7.1.2 M1062T: Las células REP se dividieron el día 6 en 4 matraces G-Rex500M. Debido a un error del operador en el sistema de filtración LOVO, se produjo una parada de emergencia durante el procedimiento que requirió una recolección manual de los TIL desde el kit desechable. Los TIL se filtraron con éxito durante una segunda ejecución de LOVO.

7.1.3 M1063T: Sin desviaciones M1064T: Sin desviaciones

7.1.4 M1065T: Las células pre-REP estaban por debajo de la especificación para el recuento de células el día 11 ($<5 \times 10^6$ células) pero continuaron en el REP. En el día 6 de REP, las células se contaron y se volvieron a colocar en el G-Rex500M y se alimentaron con 4.5 l de medio fresco. Los TIL no se expandieron en este día debido a un recuento celular insuficiente ($<1 \times 10^9$ células en el día 6 de REP).

7.1.5 EP11001T: Sin desviaciones

7.1.6 M1056T: Se cultivaron células pre-REP en LION en un matraz G-Rex 100 durante hasta 21 días. Los fragmentos de tumor se filtraron el día 11 de pre-REP y los TIL se congelaron el día de la recolección en CS10 al 100% a 30×10^6 células por vial de 1.5 ml. Los TIL congelados se descongelaron en Moffitt PD en CM1 suplementado con 6000 UI/ml de rhIL-2 y se dejaron reposar durante 3 días antes de iniciar el Día 0 del REP. El día 6 de REP, se expandieron TIL en 4 matraces que procedieron a recolectarse el día 11 de REP.

7.1.7 M1058T: Se cultivaron células pre-REP en LION en un matraz G-Rex 100 durante hasta 21 días. Los fragmentos de tumor se filtraron el día 11 de pre-REP y los TIL se congelaron el día de la recolección en CS10 al 100% a 30×10^6 células por vial de 1.5 ml. Los TIL congelados se descongelaron en Moffitt PD en CM1 suplementado con 6000 UI/ml de rhIL-2 y se dejaron reposar durante 3 días antes de iniciar el Día 0 del REP. El día 6 de REP, las células se dividieron en 4 matraces que procedieron a recolectarse el día 11 de REP.

7.1.8 M1023T: Se cultivaron células pre-REP en LION en matraces G-Rex10 durante hasta 21 días. Los fragmentos tumorales se filtraron el día 11 de pre-REP y los TIL se congelaron el día de la recolección en CS10 al 100% a 30×10^6 células por vial de 1.5 ml. Los TIL congelados se descongelaron en Moffitt PD en CM1 suplementado con 6000 UI/ml de rhIL-2 y se dejaron reposar durante 3 días antes de iniciar el Día 0 del REP. El día 6 de REP, las células se expandieron en 4 matraces que procedieron a recolectarse el día 11 de REP.

7.2 Prueba de desviaciones

7.2.1 No se realizaron análisis en profundidad de citocinas ni secuenciación de TCR

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 Desarrollo de un procedimiento más robusto. El desafío para Lion era convertir el procedimiento 1C Lion anterior, que tenía un largo tiempo de tratamiento, en un procedimiento 2A Lion potencialmente más comercializable que utiliza refinamientos que resultan en un tiempo de tratamiento más corto y una formulación final crioconservada del producto TIL. Con este fin, se llevaron a cabo nueve ejecuciones de desarrollo de procedimientos para confirmar que los procedimientos antiguos y nuevos demostraron rendimientos celulares comparables y potencia y fenotipo de TIL comparables. De particular interés fue la complejidad marcadamente disminuida del procedimiento general, lo que resultó en una reducción del 50% en la duración total de los procedimientos pre-REP y REP, pero aún así resultó en rendimientos de TIL comparables (7.8×10^9 - 67×10^9 células) en comparación al histórico procedimiento 1C Lion que se practica actualmente por nuestro fabricante

contratado. Esto se actualizó recientemente para la presentación ASCO de junio de 2017 (Media: 41.04×10^9 células con un intervalo de $1.2-96 \times 10^9$ células). Además, Lion ha desarrollado con éxito un producto TIL crioconservado que demostró una recuperación posterior a la descongelación del 78-103% con una viabilidad de TIL > 70%, de acuerdo con los criterios de liberación actuales del Procedimiento 1C (véase la Tabla 2).

- 5 8.2 El papel del análisis fenotípico extendido (Re-REP). La capacidad de proliferar en respuesta a la estimulación mitogénica (como en los re-REP experimentales presentados en este informe) es un atributo de calidad crítico de TIL. Los experimentos presentados aquí muestran que 8/9 productos TIL descongelados pudieron expandirse > 100 veces en una semana en comparación con 7/9 productos TIL frescos emparejados, lo que respalda la comparabilidad del producto TIL descongelado con el producto TIL fresco (Tabla 2). Dos atributos de calidad críticos adicionales de TIL son su capacidad para liberar IFN- γ y/o Granzima B después de la estimulación con citocinas (CD3/CD28/4-1BB). La estimulación de citocinas de los productos frescos y descongelados resultó en una liberación de IFN- γ superior a $2 \text{ ng}/10^6$ células/24 horas en 7/9 productos frescos y todos los productos descongelados (Figura 35) (véase la sección 6.2 de este informe). Se observó liberación de granzima B (Figura 36) en las 9 ejecuciones del procedimiento. Los niveles de CD4 y CD8 (Figura 39 y Figura 40) demostraron una consistencia interna notable entre los productos TIL frescos y descongelados. Además, el análisis de la capacidad del TIL para destruir una línea celular diana tumoral sustituta (P815, Figura 59) mostró que el TIL fresco y descongelado posea un potencial citotóxico similar.

- 8.3 Una prueba de estrés metabólico de TIL revela una bioenergética robusta. Un análisis de los perfiles metabólicos de productos TIL frescos y descongelados estimulados en un re-REP demostró que tanto TIL fresco como descongelado respondieron de manera similar a las pruebas de estrés metabólico y no mostró diferencias sustanciales en un panel de características metabólicas (Tabla 39). Por lo tanto, el producto TIL del Procedimiento 2A crioconservado puede considerarse comparable al producto del Procedimiento 1C fresco en función de los cuatro atributos de calidad de identidad, potencia, número de células y viabilidad presentados en este informe. Los ensayos que comparan células frescas y descongeladas emparejadas fueron bastante comparables en todos los ensayos descritos en este informe.

- 8.4 Criterios de aceptación: La heterogeneidad intrínseca de los productos TIL con terapia personalizada para cada paciente refleja: (1) sus moléculas restrictivas del complejo de histocompatibilidad principal único (la mayoría de los productos génicos polimórficos en biología humana); (2) la trayectoria evolutiva única de los tumores individuales que surgen en el microambiente tumoral con inestabilidad genómica y mutaciones únicas de impulsores y pasajeros individuales; y (3) la heterogeneidad conferida por la variación alélica, la diversidad de la región N y los reordenamientos de VDJ en los segmentos V α y V β que definen los receptores de células T usados para el reconocimiento de neoepítomos, antígenos de tumor-testicular compartidos y productos codificados viralmente. Evaluar la variación adicional que se produce como resultado de cambios en el procedimiento es, por lo tanto, una tarea abrumadora y requiere la evaluación de tantos parámetros como sea posible para asegurarse de que la "comparabilidad" de un material intrínsecamente heterogéneo sea posible. Esto se ha logrado examinando fielmente varios criterios de aceptación de viabilidad y comparabilidad, como se detalla en la Tabla 40 más adelante.

Tabla 40: Criterios de aceptación para viabilidad y comparabilidad

Punto de muestreo	Parámetro	Procedimiento de prueba	Criterios de aceptación para viabilidad	Criterios de aceptación for Comparabilidad
	Células viables totales	Contador automático de células con AOPI	$\geq 1.5 \times 10^9$ células viables	Sin importancia estadística entre brazos de ReREP fresco y congelado (valor $p < 0.05$)
	% Viabilidad	Contador automático de células con AOPI	$\geq 70\%$ viables	Sin importancia estadística entre brazos de ReREP fresco y congelado (valor $p < 0.05$)
	Pureza	Citometría de flujo	$\geq 90\%$ células T	Sin importancia estadística entre brazos de ReREP fresco y congelado (valor $p < 0.05$)
		Secuenciación de TCR	N/A	N/A
	Potencia	IFNI(ELISA	$\geq 2 \times$ fondo y $\geq 400 \text{ pg}/1 \times 10^6$ células viables/ 24hrs	Sin importancia estadística entre brazos de ReREP

				fresco y congelado (valor $p < 0.05$)
		Granzyma B ELISA	$\geq 2 \times$ fondo	N/A
		Ensayo de lisis redireccionado bioluminescente	N/A	N/A
	Respiración	Prueba de estrés de Seahorse	N/A	N/A

En base a los criterios de viabilidad enumerados en la Tabla 11, se evaluará TIL sobre si se cumplieron o no los requisitos. Se cumplieron todos los criterios individuales para cada experimento y cada línea TIL ($n=9$). Se utilizó la prueba t de Student para el análisis estadístico. Se utilizó la prueba T de Student no paramétrica para calcular el valor p para el % de viabilidad, ya que las medidas de viabilidad no serán una distribución gaussiana. Véase la Tabla 41 más adelante.

Tabla 41: Criterios de aceptación de factibilidad de cumplimiento.

Línea de TIL	Recuento de células		% Viabilidad		Pureza (citometría de flujo)		Potencia (IFNy ELISA) pg/1 $\times 10^6$ células/24h	
	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
M1061T	6.48×10^9	6.66×10^9	88.05	84.93	95.3	91.5	4570	3158
M1062T	6.76×10^9	5.70×10^9	84.45	83.73	99.7	98.9	3921	3543
M1063T	14.9×10^9	13.5×10^9	82.05	77.15	98.7	99.6	5589	5478
M1064T	8.06×10^9	7.08×10^9	86.75	83.36	84.5	89.8	619	1563
M1065T	3.06×10^9	3.10×10^9	76.35	80.90	96.8	91.4	1363	2127
EP11001T	14.9×10^9	12.2×10^9	77.9	74.85	90.4	94.3	4263	5059
M1056T	13.1×10^9	10.7×10^9	84.8	80.20	94.2	94.1	6065	4216
M1058T	23.4×10^9	20.1×10^9	87.5	85.07	99	96.2	2983	4033
M1023T	18.4×10^9	144×10^9	90.5	89.52	96.5	98.8	7918	6010
Valor p	0.1132		0.0742		0.9855		0.5821	
Significativamente diferente	No		No		No		No	

En base a los criterios de aceptación enumerados en la Tabla 40, se evaluaron re-REP TIL frescos y congelados para determinar si se cumplían o no los requisitos. (No se informó la viabilidad ya que la duración del re-REP fue de 7 días y las PBMC residuales irradiadas no pudieron distinguirse de TIL). Los números entre paréntesis indican los criterios que no se cumplieron. Según los criterios de pureza medidos con la expresión de CD3+, 6/9 productos frescos de Re-REP TIL cumplieron con los estrictos criterios $> 90\%$ (M1061, M1065 y EP11001 no lo hicieron) y 8/9 productos descongelados pasaron los criterios de aceptación incluso después de Re-REP. El bajo número de CD3+ TIL en EP11001T re-REP fresco podría atribuirse a una regulación negativa extrema del receptor de células T. La medición de CD3+ TIL como medida de pureza no se determinó para M1023T re-REP TIL descongelado. Para esta composición de TIL, la pureza se estimó usando tinción con TCRep y se indica con un asterisco (*). Se utilizó la prueba t de Student para el análisis estadístico. Véase la Tabla 42 más adelante.

Tabla 42: Cumplimiento de los criterios de aceptación de comparabilidad.

Línea de TIL	Recuento de células		Pureza (citometría de flujo)		Potencia (IFNy ELISA) pg/1 x10 ⁶ células/24h	
	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
M1061T	1.40x10 ⁶	1.77x10 ⁶	(86.1)	99.3	3638	2970
M1062T	2.64x10 ⁶	1.10x10 ⁶	99.3	97.1	1732	2060
M1063T	2.27x10 ⁶	2.21x10 ⁶	99.2	97.4	971	1273
M1064T	1.76x10 ⁶	1.15x10 ⁶	83.8	37.8	2676	1074
M1065T	3.16x10 ⁶	1.91x10 ⁶	(78.1)	(75.8)	2753	1744
EP11001T	2.02x10 ⁶	0.738x10 ⁶	(18.2)	85.4	1461	2522
M1056T	0.601x10 ⁶	1.78x10 ⁶	98.1	96.7	2374	5042
M1058T	0.740x10 ⁶	2.20x10 ⁶	98.4	99.2	770	4038
M1023T	2.69x10 ⁶	3.03x10 ⁶	97	39.9*	3512	923
Valor p	0.6815		0.3369		0.7680	
Significativamente diferente	No		No		No	

Bibliografía

- 5 Goff SL, Dudley ME, Citrin DE, Somerville RP, Wunderlich JR, Danforth DN, Zlott DA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Klebanoff CA, Hughes MS, Restifo NP, Langhan MM, Shelton TE, Lu L, Kwong ML, Ilyas S, Klemen ND, Payabyab EC, Morton KE, Toomey MA, Steinberg SM, White DE, Rosenberg SA. Randomized, Prospective Evaluation Comparing Intensity of Lymphodepletion Before Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2016 Jul 10;34(20):2389-97. doi: 10.1200/JCO.2016.66.7220. Epub 2016 May 23. PubMed PMID: 27217459; PubMed Central PMCID: PMC4981979.
- 10 Hinrichs CS, Rosenberg SA. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev.* 2014 Jan;257(1):56-71. doi:10.1111/imr.12132. Review. PubMed PMID: 24329789; PubMed Central PMCID: PMC3920180.
- 15 Jin J, Sabatino M, Somerville R, Wilson JR, Dudley ME, Stroncek DF, Rosenberg SA. Simplified procedimiento of the growth of human tumor infiltrating lymphocytes in gas-permeable flasks to numbers needed for patient treatment. *J Immunother.* 2012 Apr;35(3):283-92. doi:10.1097/CJI.0b013e31824e801f. PubMed PMID: 22421946; PubMed Central PMCID: PMC3315105.
- 20 Somerville RP, Devillier L, Parkhurst MR, Rosenberg SA, Dudley ME. Clinical scale rapid expansion of lymphocytes for adoptive cell transfer therapy in the WAVE® bioreactor. *J Transl Med.* 2012 Abr 4;10:69.
- Donia M, Larsen SM, Met O, Svane IM. Simplified protocol for clinical-grade tumor-infiltrating lymphocyte manufacturing with use of the Wave bioreactor. *Cytotherapy.* 2014 Agos;16(8):1117-20. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.004; PubMed PMID: 24831841.
- Henning AL, Levitt DE, Vingren JL, McFarlin BK. Measurement of T-Cell Telomere Length Using Amplified-Signal FISH Staining and Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2017 Ener. 5;79:7.47.1-7.47.10. doi: 10.1002/cpcy.11. PubMed PMID 28055115
- 25 Kelesidis T, Schmid I. Assessment of Telomere Length, Phenotype, and DNA Content. *Curr Protoc Cytom.* 2017 Ener. 5;79:7.26.1-7.26.23. doi: 10.1002/cpcy.12. PubMed PMID: 28055113.
- Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, Martin-Ruiz C, Shiels P, Sayer AA, Barbieri M, Bekaert S, Bischoff C, Brooks-Wilson A, Chen W, Cooper C, Christensen K, De Meyer T, Deary I, Der G, Diez Roux A, Fitzpatrick A, Hajat A, Halaschek-Wiener J, Harris S, Hunt SC, Jagger C, Jeon HS, Kaplan R, Kimura

- M, Lansdorp P, Li C, Maeda T, Mangino M, Nawrot TS, Nilsson P, Nordfjall K, Paolisso G, Ren F, Riabowol K, Robertson T, Roos G, Staessen JA, Spector T, Tang N, Unryn B, van der Harst P, Woo J, Xing C, Yadegarfar ME, Park JY, Young N, Kuh D, von Zglinicki T, Ben-Shlomo Y; Halcyon study team.. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol.* 2014 Mar;51:15-27. doi:10.1016/j.exger.2013.12.004. Epub 2013 Dic 21. Review. PubMed PMID: 24365661; PubMed Central PMCID: PMC4523138.
- Carbonari M, Tedesco T, Fiorilli M. Correlation between terminal restriction fragments and flow-FISH measures in samples over wide range telomere lengths. *Cell Prolif.* 2014 Feb;47(1):20-7. doi: 10.1111/cpr.12086. PubMed PMID: 24450811.
- Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol.* 1998 Agos.;16(8):743-7. PubMed PMID: 9702772.
- Li Y, Liu S, Hernandez J, Vence L, Hwu P, Radvanyi L. MART-1-specific melanoma tumor-infiltrating lymphocytes maintaining CD28 expression have improved survival and expansion capability following antigenic restimulation in vitro. *J Immunol.* 2010 Jan 1;184(1):452-65. doi: 10.4049/jimmunol.0901101. Epub 2009 Nov 30. PubMed PMID: 19949105.
- Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr;21(2):233-40. doi:10.1016/j.coi.2009.03.002. Epub 2009 Mar 21. Review. PubMed PMID: 19304471; PubMed Central PMCID: PMC3459355.
- Shen X, Zhou J, Hathcock KS, Robbins P, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, Hodes RJ. Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length. *J Immunother.* 2007 Ener.;30(1):123-9. PubMed PMID:17198091; PubMed Central PMCID: PMC2151201.
- Zhou J, Shen X, Huang J, Hodes RJ, Rosenberg SA, Robbins PF. Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol.* 2005 Nov 15;175(10):7046-52. PubMed PMID: 16272366; PubMed Central PMCID: PMC1351312.
- Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Mar;18(3): 175-186. doi:10.1038/nrm.2016.171. Epub 2017 Ener. 18. Review. PubMed PMID: 28096526.
- Erdel F, Kratz K, Willcox S, Griffith JD, Greene EC, de Lange T. Telomere Recognition and Assembly Mechanism of Mammalian Shelterin. *Cell Rep.* 2017 Ener. 3;18(1):41-53. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.005. PubMed PMID: 28052260; PubMed Central PMCID: PMC5225662.
- Cardenas ME, Bianchi A, de Lange T. A Xenopus egg factor with DNA-binding properties characteristic of terminus-specific telomeric proteins. *Genes Dev.* 1993 May;7(5):883-94. PubMed PMID: 7684008.
- de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Abr 12;91(8):2882-5. Review. PubMed PMID: 8159672; PubMed Central PMCID: PMC43476.
- de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol.* 1990 Feb;10(2):518-27. PubMed PMID: 2300052; PubMed Central PMCID: PMC360828.

9. Tablas adicionales

40

Tabla 43 - Figura 39: Células CD4+

Tumor ID	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
Fresco	4.85	34	10.5	41.7	64.9	64.7	4.15	12.3	8.38
Descongelado	5.68	33	11.3	49.5	61.7	62.6	3.46	17.9	7.6
ReREP fresco	8.1	23.5	19.2	39/	31.9	16.3	6.46	12.9	16.7
ReREP descongelado	11	33	15.3	49.3	39.3	26.7	9.51	17.2	19.1

Tabla 44 - Figura 40: Células CD8+

Tumor ID	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023

ES 3 008 832 T3

Fresco	45.6	54.7	85.8	38.2	28.6	22.3	93.2	84	88.8
Descongelado	50.8	55.7	76.7	37	22.8	19	92.9	76.6	84.3
ReREP fresco	63	48.3	72.4	37.9	47.8	5.87	90.3	74.5	74.4
ReREP descongelado	66.3	46.7	47	21.6	19.1	9.23	82.8	63.7	64.3

Tabla 45 - Figura 41. Células CD4+ CD154+ y Figura 105. Células CD6+ CD154+

Célula T	Marcador es	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	CD154+	76.6	nd	nd	nd	93.3	62.1	94	76.2
CD6	CD154+	37.3	nd	nd	nd	85.8	19.9	89.3	61.1

Célula T	Marcador es	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	CD154+	88.9	84	56	82.1	69.2	93.6	97	90.3
CD6	CD154+	35.6	49	12.5	19	59.1	77.88	0.025	90.1

Célula T	Marcador es	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	CD154+	91	87.2	79.1	83.1	69.3	92	92.6	86.9	77.9	86.9
CD6	CD154+	17	20.3	40	36.9	23	27.6	52.1	13.7	17.9	13.7

Célula T	Marcador es	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	CD154+	0	91.6	52.1	87.1	77	86.4	85.1	81.3	90.7	81.3
CD6	CD154+	0.00609	61.6	45.3	74.6	47.3	81.7	78.3	27.1	24.2	27.1

Tabla 46 - Figura 43: Células CD4+ CD69+ y Figura 17: Células CD8+ CD69 +

Célula T	Marcadores	M1061			M1062			M1063			M1064		
		Fresco	Re-REP	Descongelado	Fresco	Re-REP	Descongelado	Fresco	Re-REP	Descongelado	Fresco	Re-REP	Descongelado
CD4	CD69+	33.9	nd	nd	nd	nd	nd	82.2	68.8	61.3	51.3	84.8	78.6
CD8	CD69+	22.4	nd	nd	nd	nd	nd	83	78.3	67.8	67.8	78.6	78.6
Célula T	Marcadores	M1061			M1062			M1063			M1064		
		Re-REP	Re-REP	Descongelado	Re-REP	Re-REP	Descongelado	Re-REP	Re-REP	Descongelado	Re-REP	Re-REP	Descongelado
CD4	CD69+	58.7	69.6	67.6	77.6	77.6	86.7	85.5	85.5	85.5	85.5	85.5	85.5
CD8	CD69+	80.9	80	62.7	73.2	87.6	87.9	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2
Célula T	Marcadores	M1065			EP11001			M1056			M1058		
		Fresco	Re-REP	Descongelado	Fresco	Re-REP	Descongelado	Fresco	Re-REP	Descongelado	Fresco	Re-REP	Descongelado
CD4	CD69+	82.7	84.4	78.7	58.3	83.9	84.9	89.7	89.7	84.8	89.7	89.7	89.7
CD8	CD69+	78.9	72.3	69.5	54.5	80.3	86	68	68	77.8	41.3	41.3	40.8
Célula T	Marcadores	M1065			EP11001			M1056			M1058		
		Re-REP	Re-REP	Descongelado	Re-REP	Re-REP	Descongelado	Re-REP	Re-REP	Descongelado	Re-REP	Re-REP	Descongelado
CD4	CD69+	90.2	93.2	74.7	39.1	95.1	93.8	91.1	91.1	93.7	91.1	91.1	91.1
CD8	CD69+	91.3	90.5	87.6	52.9	95.4	94.2	93.1	93.1	93.6	93.1	93.1	93.1

Tabla 47 - Figura 45: Células CD4+ CD137+ y Figura 19 células CD8+ CD137+

Célula T	Marcadores	M1061			M1062			M1063			M1064		
		Fresco	Descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	CD137+	19.8	nd	nd	nd	nd	nd	65.4	30.4	nd	nd	nd	1.31
CD8	CD137+	19.8	nd	nd	nd	nd	nd	65.4	30.4	nd	nd	nd	1.31
Célula T	Marcadores	M1061			M1062			M1063			M1064		
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	CD137+	15.4	30.4	73	78.1	62.6	53.2	64.4	53.2	51.6	64.7	51.6	64.7
CD8	CD137+	28.8	43.1	39.3	35.3	64.4	65.7	64.4	65.7	71.1	81	71.1	81
Célula T	Marcadores	M1065			EP11001			M1056			M1058		
		Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	CD137+	524	7.26	7.78	5.4	4.28	3.65	6.89	4.6	4.28	9.67	4.28	9.67
CD8	CD137+	3.23	7.26	7.78	5.4	4.28	3.65	6.89	4.6	4.28	9.67	4.28	9.67
Célula T	Marcadores	M1065			EP11001			M1056			M1058		
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	CD137+	31.1	24.6	65.1	47.8	221	18.6	61.6	56.9	49.8	50.8	49.8	50.8
CD8	CD137+	50.9	33.8	57.3	54.6	77.3	78.8	76.9	87	58	50.3	58	50.3

Tabla 48 - Figura 47: Células CM CD4+ y Figura 21 células CM CD8+

Célula T	Marcadores	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	CM	1.03	n/d	0.59	0.29	10.4	2.08	14.4	0.13
CD8	CM	0.37	n/d	0.9	0.17	3.2	0.56	73.2	0.13
Célula T	Marcadores	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	CM	2.32	7.71	13.8	12.6	13.4	22.3	15.9	18.6
CD8	CM	1.85	9.38	6.48	14.2	15.7	25.7	24.2	25.8
Célula T	Marcadores	M1065		EP11001		M1066		M1069	
		Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	CM	0.42	0.53	0.48	1.17	1.83	1.36	1.8	1.79
CD8	CM	0.21	0.67	2.65	1.79	0.33	0.91	0.67	2.22
Célula T	Marcadores	M1065		EP11001		M1066		M1069	
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	CM	7.03	2.28	18.8	3.73	48.6	20.1	12.6	12.7
CD8	CM	5.05	1.6	11.4	3.37	25.8	21.6	19.8	7.59

Tabla 49 - Figura 48: Cálulas EM CD4+ y Figum 23 Células EM CD8+

Célula T	Marcadores	M1061			M1062			M1063			M1064		
		Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	EM	90	nd	98.3	98.9	93.9	97.2	84.1	99.8				
CD8	EM	89.1	nd	80.6	87.9	92.4	97.6	20.6	96.9				
Célula T	Marcadores	M1061			M1062			M1063			M1064		
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	EM	85.6	84.4	84.5	83.4	84.3	73.7	80.6	80.4				
CD8	EM	87.2	87.9	90.8	82.3	82.5	72.2	74.5	73				
Célula T	Marcadores	M1065			EP11001			M1056			M1058		
		Fresco	Descongelado	Fresco	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco
CD4	EM	98.4	98.4	96.7	96.7	97.4	97.1	97.8	97.4	97.6	98.2	95.3	
CD8	EM	98.3	98.6	91.6	91.6	95.5	98.8	98.9	98.8	99.2	93.9	95.2	
Célula T	Marcadores	M1065			EP11001			M1056			M1058		
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco
CD4	EM	91.7	87	74.3	74.3	80.7	86.2	25.5	73.9	81.8	73.1	76.4	
CD8	EM	91.5	96.1	83	83	90.8	73.2	71.9	77.1	78.2	84.1	85.1	

Tabla 50 - Figura 51: Células CD4+ CD28+ y Figura 25 células CD8+ CD38+

Célula T	Marcadores	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	CD28+	4.6	5.65	33.2	37	10.5	11.2	31.9	27.6
CD8	CD28+	30.1	34	24.5	23.1	83.8	49.3	22.5	15.5
Célula T	Marcadores	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	CD28+	6.75	7.16	21.6	27.6	18.6	15	23	27.6
CD8	CD28+	24.6	17.9	10	6.4	28.6	18.9	15.7	11
Célula T	Marcadores	M1065		EP11011		M1056		M1058	
		Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	CD28+	41.7	38.2	63.2	59.8	3.29	12.2	17.5	7.48
CD8	CD28+	13.4	8.52	14.5	12	53	56.5	62.1	80.8
Célula T	Marcadores	M1065		EP11001		M1056		M1058	
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	CD28+	12.3	15.2	13.3	20	9.29	12.3	16.5	17.9
CD8	CD28+	6.9	2.43	2.07	3.75	34	27	36.9	43.9

Tabla 51 - Figura 53: Cálulas CD4+ PD-1+ y Figura 27 células CD8+ PD-1+

Célula T	Marcadores	M1061			M1062			M1063 M1064		
		Fresco	Descongela do	Descong elado	Fresco	Re-REP descongela do	Re-REP descongela do	Fresco	Re-REP descongela do	Descongela do
CD4	PD-1+	48.5	nd	nd	nd	nd	nd	77	40.6	22.4
CD8	PD-1+	37.1	nd	nd	nd	nd	nd	56	24.6	14
Célula T	Marcadores	M1061			M1062			M1063		
		Re-REP fresco	Re-REP descongela do	Re-REP descongela do	Re-REP fresco	Re-REP descongela do	Re-REP descongela do	Re-REP fresco	Re-REP descongela do	Re-REP descongela do
CD4	PD-1+	36.6	34.2	26.7	15.7	43.9	66	32.4	14.5	
CD8	PD-1+	40.4	35.3	6.21	6.3	18	20.4	35.6	23.2	
Célula T	Marcadores	M1056			EP11001			M1058		
		Fresco	Descongela do	Fresco	Descongela do	Fresco	Descongela do	Fresco	Descongela do	Fresco
CD4	PD-1+	7.87	7.23	33.3	26.2	33.9	32.6	41.7	38	23.8
CD8	PD-1+	1.61	0.72	19.2	12.6	23.8	24.7	78.4	59.8	36.1
Célula T	Marcadores	M1065			EP11001			M1058		
		Re-REP fresco	Re-REP descongela do	Re-REP descongela do	Re-REP fresco	Re-REP descongela do	Re-REP descongela do	Re-REP fresco	Re-REP descongela do	Re-REP descongela do
CD4	PD-1+	22.4	15.5	40.9	33.4	56	51.3	32.5	19.9	27.3
CD8	PD-1+	6.49	5.73	29.8	34.6	18.9	15.2	47	28.9	36.1

Tabla 52 - Figura 55. Células CD4+ LAG3+ y Figura 29 células CD8+ LAG3+

Célula T	Marcadores	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	LAG3+	16.8	nd	nd	nd	93.5	97.3	nd	6.6
CD8	LAG3+	74	nd	nd	nd	98.4	81.5	nd	31.8
Célula T	Marcadores	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	LAG3+	68.3	73.1	55.2	58.9	26.9	27.3	52.6	64
CD8	LAG3+	98.3	99.7	97.1	97.7	89.6	85.1	92.8	94.7
Célula T	Marcadores	M1055		EP11301		M1058		M1203	
		Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado	Fresco	Descongelado
CD4	LAG3+	47.2	20.6	26.6	20.1	49.8	36	14.5	7.85
CD8	LAG3+	85.3	38.7	69.8	64.2	83.4	81.9	86.3	71.1
Célula T	Marcadores	M1055		EP11301		M1058		M1203	
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado	Re-REP fresco	Re-REP descongelado
CD4	LAG3+	65.6	68.2	40.9	46	44.1	52.1	51	17.7
CD8	LAG3+	95.4	97.8	93.4	92.5	98.4	98.2	98.3	78.1

Tabla 53 - Figura 57. Células CD4+ TIM-3+ y Figura 31 Células CD8+ TIM-3+

Célula	Marcadores	M1061			M1062			M1063			M1064		
		Fresco	Descongelado	nd	Fresco	Descongelado	nd	Fresco	Descongelado	nd	Fresco	Descongelado	nd
CD4	TIM3+	89.7	nd	nd	nd	nd	nd	98.3	87.6	nd	nd	43.2	nd
CD8	TIM3+	98	nd	nd	nd	nd	nd	99.4	88.1	nd	nd	47	nd

Célula	Marcadores	M1061			M1062			M1063			M1064		
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado		Re-REP fresco	Re-REP descongelado		Re-REP fresco	Re-REP descongelado		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	
CD4	TIM3+	95.3	86	84.5	96.9	96.7	94.2	90.6	90.2	94.2	94.2	82.6	95.7
CD8	TIM3+	96.9	88.9	97.3	96.7	96.7	98.2	97.1	97.7	98.2	98.2	95.7	95.7

Célula	Marcadores	M1055			EP11001			M1056			M1058		
		Fresco	Descongelado	nd	Fresco	Descongelado	nd	Fresco	Descongelado	nd	Fresco	Descongelado	nd
CD4	TIM3+	95	78.6	96.9	96.9	91.5	96.4	92.5	88.7	80.1	89.9	82.3	nd
CD8	TIM3+	96.9	50.6	96.8	96.8	83	96.3	92.9	96.5	73.8	98.2	88.5	nd

Célula	Marcadores	M1055			EP11001			M1056			M1058		
		Re-REP fresco	Re-REP descongelado		Re-REP fresco	Re-REP descongelado		Re-REP fresco	Re-REP descongelado		Re-REP fresco	Re-REP descongelado	
CD4	TIM3+	91.1	85.4	94.3	96.7	96.7	74	75.4	86.5	87.3	94.4	90.6	97.7
CD8	TIM3+	94.9	96.5	96.3	96.3	96.3	88	89	97.3	98.6	99	97.7	97.7

Tabla 54 - Figura 61: Determinación de qPCR y Flow-FISH de la repetición de la longitud de los telómeros

ID de Tumor	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
qPCR	0.111878	0.135842	0.149685	0.179244	0.151774	0.137738	0.134904	0.124137	0.086569
Flow-FISH	9.330236	1215041	8.782231	7.174627	8.961553	6112918	9.010615	7.944534	5.766692

EJEMPLO 20: NUEVOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR CRIOCONSERVADOS (LN-144) ADMINISTRADOS A PACIENTES CON MELANOMA METASTÁSICO

Los nuevos linfocitos infiltrantes de tumores crioconservados (LN-144) administrados a pacientes con melanoma metastásico demuestran eficacia y tolerabilidad en un ensayo clínico multicéntrico de fase 2

5 INTRODUCCIÓN:

Se ha estudiado la seguridad y eficacia de la terapia celular adoptiva (ACT) con linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) no crioconservados en cientos de pacientes con melanoma metastásico. Este ensayo clínico multicéntrico se inició con TIL de fabricación centralizada (LN-144) como productos de infusión no crioconservados y crioconservados. Nuestro nuevo procedimiento de fabricación para el LN-144 no crioconservado se utiliza en la Cohorte 1, y un LN-144 crioconservado acortado de 3 semanas se utiliza en la Cohorte 2. La fabricación de la Cohorte 2 ofrece un procedimiento significativamente más corto, junto con un producto TIL crioconservado lo que permite la flexibilidad de la programación y la dosificación del paciente. El procedimiento de fabricación más corto reduce el tiempo de espera para que el paciente reciba su producto TIL y la crioconservación agrega comodidad a la logística y la entrega a los sitios clínicos.

15 PROCEDIMIENTOS:

El C-144-01 es un estudio multicéntrico prospectivo que evalúa a pacientes con melanoma metastásico que reciben LN-144. Después de una linfodepleción no mieloablativa con el régimen de preacondicionamiento de Cy/Flu, los pacientes reciben una única infusión de LN-144 seguida de la administración de IL-2 (600,000 UI/kg) hasta 6 dosis. Se evalúa la respuesta objetiva de los pacientes como criterio de valoración principal durante un período de hasta 24 meses.

RESULTADOS:

Caracterizamos el LN-144 crioconservado administrado a una segunda cohorte de pacientes, Cohorte 2 (N=10) siguiendo el mismo régimen de tratamiento de infusión antes y después de TIL que se usó para la Cohorte 1.

Los pacientes de la cohorte 2 fueron tratados previamente en gran medida con un mayor número de líneas previas con todos los pacientes con terapias anti-CTLA-4 y anti-PD-1, y una mayor carga tumoral (media SOD: 15.3, 10.9 cm para las cohortes 2, 1). La mediana del número de terapias sistémicas previas es 4, 3 para las cohortes 2, 1, respectivamente. Un análisis inicial de los datos de seguridad demuestra una tolerabilidad comparable de LN-144 crioconservado. El perfil de seguridad para los pacientes de la Cohorte 1 que reciben LN-144 no crioconservado sigue siendo aceptable para esta población de pacientes en etapa avanzada. Los TEAE más comunes observados en ambas cohortes por frecuencia son náuseas, anemia, neutropenia febril, disminución del recuento de neutrófilos y disminución del recuento de plaquetas. La revisión temprana de los datos de eficacia indica actividad antitumoral, incluida la RP, para la terapia TIL observada en pacientes tratados en la Cohorte 2.

CONCLUSIONES:

Esto representa el primer ensayo clínico en un entorno multicéntrico con TIL fabricado centralmente que evalúa un procedimiento nuevo para un producto autólogo crioconservado con un procedimiento significativamente más corto (alrededor de 3 semanas). Los resultados preliminares indican que el LN-144 crioconservado es una opción terapéutica segura y tolerable para los pacientes con melanoma metastásico que han fallado en múltiples terapias anteriores, incluidos los inhibidores de puntos de control. El LN-144 crioconservado proporciona una mayor flexibilidad para los pacientes y los cuidadores y permite un tratamiento más inmediato para los pacientes con una necesidad médica insatisfecha tan alta. NCT02360579.

EJEMPLO 21: EVALUACIÓN DE MEDIOS SIN SUERO PARA USO EN EL PROCEDIMIENTO 2A

Este ejemplo proporciona datos que muestran la evaluación de la eficacia de los medios sin suero como reemplazo de los medios estándar CM1, CM2 y CM4 que se utilizan actualmente en el procedimiento 2A. Este estudio evaluó la eficacia de los medios sin suero (SFM) disponibles y las alternativas sin suero como reemplazo en tres fases;

Fase -1: se comparó la eficacia de la expansión de TIL (n=3) usando medios sin suero estándar frente a CTS Optimizer o Prime T CDM o Xvivo-20 con o sin reemplazo de suero o lisado de plaquetas.

Fase-2: se probó la condición de medio libre de suero candidato en un procedimiento 2A a pequeña escala usando G-Rex 5M (n=3).

INFORMACIÓN DE ANTECEDENTES

Aunque la combinación de medios actual utilizada en el cultivo Pre y Post REP ha demostrado ser eficaz, pueden producirse fallos de REP con el AIM-V. Si se identificara una alternativa efectiva sin suero, el

procedimiento sería más directo y simple de realizar en los CMO al reducir el número de tipos de medios utilizados de 3 a 1. Además, SFM reduce la posibilidad de enfermedad inesperada al eliminando el uso de suero humano. Este ejemplo proporciona datos que demostraron que respaldan el uso de medios sin suero en los procedimientos 2A.

5 ABREVIATURAS

µl: microlitro

CM1,2,4: Medios completos 1,2,4

CTS OpTimizer SFM: Sistema de terapia celular, medios sin suero OpTimizer

g: gramos

10 Hr: Hora

IFU: Instrucciones de uso

IL-2: citocina interleucina-2

Min: Minuto

mL: mililitro

15 °C: grados Celsius

PreREP: Protocolo de expansión rápida previa

REP: Protocolo de expansión rápida

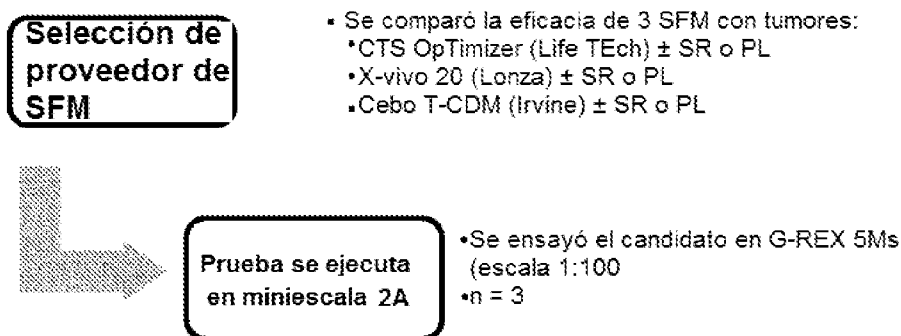
RT: temperatura ambiente

SR: Reemplazo de suero

20 TIL: linfocitos infiltrantes de tumores

DISEÑO DE EXPERIMENTO

Los Pre-REP y REP se iniciaron como se menciona en LAB-008. La descripción general de estas 3 fases del experimento se mostró en el siguiente cuadro:



25 Como se indica en el cuadro anterior, el proyecto se sugirió para probar los medios y suplementos sin suero en dos etapas.

Etapa 1. Selección del proveedor de medios sin suero. preREP y postREP se configuraron para imitar el procedimiento 2A en una placa de 24 pocillos G-Rex. PreREP se inició cultivando cada fragmento/pocillo de placa G-Rex de 24 pocillos por triplicado o cuatuplicado según las condiciones. REP se inició el día 11 cultivando 4 x 10⁵ TIL/pocillo de G-Rex 24 pocillo; dividido el día 16, recolección el día 22. Se utilizaron CTS OpTimizer, X-Vivo 20 y Prime T-CDM como alternativas de medios sin suero potenciales para usar en PreREP y REP. Reemplazo de suero SR Inmune CTS (Life Technologies) o suero de lisado de plaquetas (SDBB) se añadieron al 3% a SFM. Se planificó que cada condición se probara con al menos 3 tumores tanto en preREP como en postREP para imitar el procedimiento 2A.

Etapa 2. Los candidatos identificados se probaron adicionalmente en procedimientos 2A a pequeña escala por protocolo (TP-17-007). Brevemente, los preREP se iniciaron cultivando 2 fragmentos/matraz G-Rex 5M por triplicado por condición. Los REP se iniciaron el día 11 usando 2 x 10e6/matraz G-Rex 5M; divididos el día 16, recolección el día 22.

- 5 Nota: Algunos tumores se procesaron y configuraron para medir múltiples parámetros en un experimento.

OBSERVACIONES

Resultados equivalentes o estadísticamente mejores fueron observados en el crecimiento celular cuando se comparó un medio sin suero con el estándar utilizado en el procedimiento 2A

- 10 Se observó un fenotipo, una producción de IFN- γ y un análisis de metabolitos similares de los TIL cultivados en medio libre de suero en comparación con los TIL cultivados en el medio estándar usado en el procedimiento 2A.

RESULTADOS

Prueba de la eficacia de los medios sin suero en la expansión pre y pos REP TIL.

- 15 CTS Optimizer + SR (reemplazo de suero) mostró una expansión preREP TIL mejorada y una expansión REP TIL comparable. Se agregaron CTS OpTimizer, X-Vivo 20 y Prime T-CDM con o sin 3% de CTS Immune CTS SR, se probaron contra condiciones estándar. En M1079 y L4026, la condición CTS OpTimizer + CSR mostró una expansión TIL preREP significativamente mejorada ($p < 0.05$) en comparación con las condiciones estándar (CM1, CM2, CM4) (Figura 62A). Por el contrario, CTS Optimizer sin CSR no ayudó a la expansión previa a REP TIL (Apéndice -1,2,3). CTS Optimizer + CSR mostró una expansión de TIL comparable en PostREP en los dos tumores de 3 probados (Figura-2B). Se produjo una gran variación en el REP antes y después de las condiciones de X-Vivo 20 y Prime T-CDM, mientras que CTS Optimizer fue relativamente consistente entre los cuatuplicados. Además, el lisado de plaquetas agregado SFM no mejoró la expansión de TIL preREP y postREP en comparación con los estándares (Figura 62A). Estos hallazgos sugieren que el reemplazo de suero ciertamente es necesario para proporcionar un crecimiento comparable a nuestro estándar; optimizador de CTS + CSR puede ser un candidato.
- 25

Probar la condición de candidato en la mini báscula G-Rex 5M (véase Figura 64).

Análisis fenotípico de Post REP TIL. Véase la Figura 66 y la Tabla 56 más adelante.

Tabla 56: Inclínación de CD8 con CTS OpTimizer

	Promedio %CD8+	
	Estándar	CTS
M1078	11	34
M1079	29.3	43.85
M1080	33.67	54.37
L4020	0.02	0.17
EP11020	28.67	25.07
L4030	0.13	0.09
L4026	9.45	34.06
M1092	5.75	52.47
T6030	66	52.6

- 30 Comparabilidad de interferón-gamma

ELISA de interferón-gamma (Quantikine). La producción de IFN- γ se midió utilizando el kit Quantikine ELISA mediante sistemas de R&D. CTS + SR produjo cantidades comparables de IFN- γ en comparación con nuestra condición estándar. Véase la Figura 67.

EJEMPLO 22: CÓCTEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS T IL-2/IL-15/IL-21 MEJORA LA FUNCIÓN DE EXPANSIÓN Y EFECTORA DE LAS CÉLULAS T INFILTRANTES DE TUMOR

La terapia de células T adoptivas con linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) autólogos ha demostrado eficacia clínica en pacientes con melanoma metastásico y carcinoma cervical. En algunos estudios, los mejores resultados clínicos se han correlacionado positivamente con la cantidad total de células infundidas y/o el porcentaje de células T CD8+. La mayoría de los regímenes de producción actuales utilizan únicamente IL-2 para promover el crecimiento de TIL. Se ha informado una mayor expansión de linfocitos utilizando regímenes que contienen IL-15 e IL-21. Este estudio describe los efectos positivos de agregar IL-15 e IL-21 al protocolo IL-2-TIL de segunda generación implementado recientemente en la clínica.

10 Materiales y procedimientos

El procedimiento de generación de TIL incluye un protocolo de expansión rápida previa (pre-REP), en donde se colocan fragmentos tumorales de 1-3 mm³ de tamaño en medios que contienen IL-2. Durante el pre-REP, TIL emigra fuera de los fragmentos tumorales y se expande en respuesta a la estimulación de IL-2.

Para estimular aún más el crecimiento de TIL, TIL se expande a través de un período de cultivo secundario denominado Protocolo de Expansión Rápida (REP) que incluye alimentadoras de PBMC irradiadas, IL-2 y anti-CD3. En este estudio, se desarrolló un protocolo de expansión pre-REP y REP abreviado para expandir TIL mientras se mantienen los atributos fenotípicos y funcionales del producto TIL final.

Este protocolo de producción de TIL abreviado se utilizó para evaluar el impacto de IL-2 sola frente a una combinación de IL2/IL-15/IL-21. Estos dos regímenes de cultivo se compararon para la producción de TIL cultivada a partir de tumores colorrectales, melanomas, cervicales, de mama triple negativo, pulmón y renales. Una vez completado el pre-REP, se evaluó la expansión, el fenotipo, la función (CD107a+ e IEN γ) y el repertorio de TCR V β de los TIL cultivados.

Los cultivos pre-REP se iniciaron usando el protocolo estándar de IL-2 (600 UI/ml), o con IL-15 (180 UI/ml) e IL-21 (UI/ml) además de IL-2. Se evaluó la expansión de las células al completar el pre-REP. Un cultivo se clasificó como con un aumento de la expansión sobre la IL-2 si el crecimiento general se mejoraba en al menos un 20%. En este documento se presentan los estudios fenotípicos y funcionales de melanoma y pulmón. Véase la Tabla 57 más adelante.

Tabla 57: Mejora de la expansión durante el pre-REP con IL-2/IL-15/IL-21 en múltiples indicaciones

Histología de tumor	# de estudios IL-2 versus IL-2/IL-15/IL-21	# de estudios que demuestran >20 % de mejoría de crecimiento usando IL-2/IL-15/IL-21 (en comparación con IL-2)
Melanoma	5	1/5(20%)
Pulmón	8	3/8 (38%)
Colorrectal	11	7/11 (63%)
Cervical	1	1/1 (100%)
Pancreático	2	2/2 (100%)
Glioblastoma	1	1/1 (100%)
De mama triple negativo	1	1/2 (50%)

Estos datos demuestran un aumento del rendimiento del producto TIL cuando se cultivaron TIL con IL-2/IL15/IL-21 en comparación con IL-2 sola, además de diferencias fenotípicas y funcionales en el pulmón.

El efecto del cóctel triple sobre la expansión de TIL fue específico de la indicación y benefició a la mayoría de los tumores de bajo rendimiento.

La relación de células T CD8+/CD4+ aumentó mediante el tratamiento en el producto TIL de NSCLC.

La actividad de las células T pareció potenciada por la adición de IL-15 e IL-21 a IL-2, según lo evaluado por los niveles de expresión de CD107a tanto en melanoma como en NSCLC.

Los datos proporcionados aquí muestran que la expansión de TIL usando un procedimiento más corto y robusto, como el procedimiento 2A descrito aquí en la solicitud y otros ejemplos, se puede adaptar para abarcar el cóctel de citocinas IL-2/IL-15/IL-21, lo que proporciona un medio para promover aún más la expansión de TIL en particular en indicaciones específicas.

- 5 Los experimentos en curso están evaluando adicionalmente los efectos de IL-2/IL-15/IL-21 sobre la función de TIL.

Experimentos adicionales evaluarán el efecto del cóctel triple durante el REP (primera expansión).

- 10 Estas observaciones son especialmente relevantes para la optimización y estandarización de los regímenes de cultivo de TIL necesarios para la fabricación a gran escala de TIL con la amplia aplicabilidad y disponibilidad requeridas de una terapia anticáncer de corriente principal.

EJEMPLO 23: UN TIL CRIOPRESERVADO GENERADO CON UN PROCEDIMIENTO ABREVIADO

Antecedentes

- 15 Este ejemplo proporciona datos relacionados con un producto de linfocitos infiltrantes de tumores crioconservados (TIL) para LN-144, generado con un procedimiento abreviado adecuado para la fabricación comercial de alto rendimiento que presenta atributos de calidad favorables para la transferencia de células adoptivas (ACT).

- 20 Los procedimientos existentes para generar productos de TIL clínicos implican intervenciones abiertas del operador seguidas de períodos de incubación prolongados para generar un producto terapéutico. El procedimiento de Generación 1 toma alrededor de 6 semanas y produce un producto fresco. Para llevar la terapia TIL a todos los pacientes que puedan beneficiarse de su potencial, se desarrolló un procedimiento de cultivo abreviado de 22 días, Generación 2, adecuado para la fabricación centralizada con un producto farmacológico crioconservado capaz de enviarse a sitios clínicos distantes. La Generación 2 representa un procedimiento de producción de células flexible, robusto, cerrado y semiautomatizado que se adapta a la fabricación de alto rendimiento a escala comercial. Los productos farmacéuticos generados por este procedimiento tienen atributos de calidad comparables a los generados por el procedimiento de Generación 1.

Objetivos del estudio:

Los productos farmacéuticos generados por los procedimientos de Generación 1 (una forma de realización del procedimiento 1C) y Generación 2 (una forma de realización del procedimiento 2A) se ensayaron para determinar la comparabilidad en términos de los siguientes atributos de calidad:

- 30 Dosis y expansión múltiple.

Pureza de células T y proporciones de subconjuntos de células T.

Expresión fenotípica de moléculas coestimuladoras en subconjuntos de células T.

Longitud relativa media de las repeticiones de los telómeros.

Capacidad para secretar citocinas en respuesta a la reactivación de TCR.

- 35 Diversidad de receptores de células T.

Descripción general del procedimiento de terapia TIL:

EXTRACCIÓN: Los TIL del paciente se eliminan del microambiente tumoral supresor (mediante extirpación quirúrgica de una lesión)

- 40 EXPANSIÓN: TIL se expandió exponencialmente en cultivo con IL-2 para producir 10^9 - 10^{11} TIL, antes de infundirlos en el paciente.

PREPARACIÓN: El paciente recibe NMA-LD (linfodepleción no mieloablativa, ciclofosfamida: 60 mg/kg, IV x 2 dosis y fludarabina: 25 mg/m² x 5 dosis) para retirar el microambiente tumoral potencialmente supresor y maximizar el injerto y la potencia de Terapia TIL

- 45 INFUSIÓN: Se infunde al paciente con su TIL expandido (LN-144) y una dosis alta de IL-2 de corta duración (600,000 UI/kg para hasta 6 dosis) para promover la activación, proliferación y actividad citolítica antitumoral de TIL

Tabla 58: Resumen de las mejoras del procedimiento en la fabricación de segunda generación

Etapa de procedimiento	Gen 1	Gen 2	Impacto
Cultivo de fragmento	≤21 días, bio-reactores múltiples, múltiples intervenciones de operador	≤11 días, bio-reactor individual cerrado, sin intervención	Abrevia cultivo, reduce intervenciones, dispuesto a automatización.
Selección de TIL	TIL expandidos de IL-2 crioconservados, selección basada en fenotipo, descongelados, ≤ 30x10 ⁶ TIL a co-cultivo	≤ 200x10 ⁶ de TIL a granel directo a co-cultivo	Abrevia procedimiento dejando siembra aumentada de co-cultivo, reduce etapas, elimina pruebas
Expansión rápida	≤ 36 Bio-reactores, 14 días	≤ 5 Bio-reactores, 11 días	Reduce intervenciones de operador, sistema cerrado, abrevia procedimiento, dispuesto a automatización.
Recolección / lavado	Reducción de volumen abierto y recolección manual. Lavado manual y concentración mediante centrifugación.	Reducción de volumen abierto y recolección semi-automática cerrada. Lavado y concentración automáticos.	Reduce intervenciones de operador, automatizado, mantiene sistema cerrado.
Formulación	Producto hipotérmico fresco (2-8°C)	Producto crioconservado (≤ -150°C)	Flexibilidad de envío, programación de paciente, más fácil prueba de liberación, pruebas experimentales globales
Tiempo de fabricación	Tiempo de procedimiento 38 días	Tiempo de procedimiento 22 días	Entrega al paciente, rendimiento de sala limpia, COGs

Procedimientos analíticos e instrumentación:

5 Dosis y viabilidad: Se tomaron muestras de los productos formulados finales y se analizaron las células nucleadas totales, las células viables totales y la viabilidad determinada por contratinción de naranja de acridina/DAPI usando el contador celular automático NC-200.

Citometría de flujo: Se tomaron muestras de los productos farmacéuticos formulados y se ensayó su identidad mediante FACS. El porcentaje de células T se determinó como la población CD45, CD3 doble positiva de células viables. Los viales satélite o centinela congelados para cada procedimiento se descongelaron y se analizaron en busca de marcadores fenotípicos extendidos, incluidos CD3, CD4, CD8, CD27 y CD28.

10 Longitud relativa media de las repeticiones de los telómeros: se utilizó la tecnología Flow-FISH para medir la longitud media de las repeticiones de los telómeros. Este ensayo se completó como se describe en el protocolo DAKO® Telomere PNA Kit/FITC para citometría de flujo. Brevemente, se combinaron 2 x 10⁶ células TIL con 2 x 10⁶ células de leucemia 1301. El ADN se desnaturalizó a 82°C durante 10 minutos y la sonda PNA-FITC se hibridó en la oscuridad durante la noche a temperatura ambiente. Se utilizó yoduro de propidio para identificar las células en la fase G0/1.

15 Inmunoensayos: se midió la capacidad del producto farmacológico para secretar citocinas tras la reactivación después de un cocultivo con perlas recubiertas de mAb (Life Technologies, anti-CD3, anti-CD28 & anti-CD137). Después de 24 horas, los sobrenadantes del cultivo se recogieron, se congelaron, se descongelaron y se ensayaron mediante ELISA usando el kit Quantikine IFNγ ELISA (sistemas de R&D) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Diversidad del receptor de células T: se aisló el ARN de los productos formulados finales y se sometió a una PCR multiplex con cebadores específicos de VDJ. Las secuencias de CDR3 expresadas dentro del producto de TIL se amplificaron semicuantitativamente para determinar la frecuencia y prevalencia de clones de TIL

únicos. La secuenciación se realizó en el secuenciador de sobremesa Illumina MiSeq. Los valores se indexaron para producir una clasificación representativa de la diversidad relativa de receptores de células T en el producto.

Resultados y Conclusiones:

Los resultados se proporcionan en las Figuras 75 a 81.

- 5 El procedimiento de Generación 2 produce un producto TIL con atributos de calidad comparables a los de Generación 1.

La Generación 2 produce cantidades similares de productos TIL altamente puros que se componen de porciones similares de subconjuntos de células T que expresan niveles comparables de moléculas coestimuladoras en relación con Gen 1.

- 10 Los TIL de generación 2 muestran una mayor diversidad de receptores de TCR que, cuando se activan, inician una secreción robusta de citocinas.

El producto farmacéutico crioconservado introduce eficiencias logísticas críticas que permiten flexibilidad en la distribución.

- 15 A diferencia de los procedimientos anteriores, la plataforma de expansión de 22 días abreviada de Generación 2 presenta una plataforma de fabricación de TIL escalable y logísticamente factible que permite la generación rápida de dosis a escala clínica para pacientes que necesitan terapia urgente.

El protocolo de fabricación de TIL de Generación 2 aborda muchas de las barreras que hasta ahora han obstaculizado la aplicación más amplia de la terapia TIL.

- 20 **EJEMPLO 24:** EVALUACIÓN DE UNA GAMA DE CÉLULAS ALIMENTADORAS ALOGÉNICAS: RELACIONES de TIL DE 100:1 A 25:1

Este estudio probó la proliferación de TIL a 25:1 y 50:1 frente al control de células alimentadoras alogénicas a TIL de 100: 1 actualmente utilizadas en el Procedimiento 1C.

- 25 Los estudios publicados por la División de Cirugía del Instituto Nacional del Cáncer han demostrado el umbral para la activación óptima de TIL en el matraz G-Rex 100 a 5×10^6 células alimentadoras alogénicas por cm^2 al inicio del REP⁽¹⁾. Esto se ha verificado mediante modelos matemáticos y, con el mismo modelo, se predijo que con una capa de alimentadoras optimizada para el contacto célula: célula por unidad de área, la relación de células alimentadoras alogénicas en relación con TIL puede reducirse a 25:1 con un efecto mínimo en la activación y la expansión de TIL.

- 30 Este estudio estableció una densidad óptima de células alimentadoras por unidad de área al inicio de REP y validó el intervalo efectivo de relaciones de alimentadoras alogénicas al inicio de REP necesarias para disminuir y normalizar la cantidad de células alimentadoras utilizadas por lote clínico. El estudio también validó el inicio del REP con menos de 200×10^6 TIL cocultivados con un número fijo de células alimentadoras.

A. Volumen de una célula T (10 μm de diámetro): $V = (4/3) \pi r^3 = 523.6 \mu\text{m}^3$

B. Columna de G-Rex 100 (M) con una altura de 40 μm (4 células): $V = (4/3) \pi r^3 = 4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3$

- 35 C. Número de célula requerida para llenar la columna B: $4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3 / 523.6 \mu\text{m}^3 = 7.6 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \times 0.64 = 4.86 \times 10^8$

D. Número de células que se pueden activar de manera óptima en el espacio 4D: $4.86 \times 10^8 / 24 = 20.25 \times 10^6$

E. Número de alimentadoras y TIL extrapolados a G-Rex 500: TIL: 100×10^6 y alimentador: 2.5×10^9

- 40 Ecuación 1. Aproximación del número de células mononucleares necesarias para proporcionar una geometría icosaédrica para la activación de TIL en un cilindro con una base de 100 cm^2 . El cálculo deriva el resultado experimental de $\sim 5 \times 10^8$ para la activación del umbral de células T que refleja de cerca los datos experimentales del NCI. ⁽¹⁾ (C) El multiplicador (0.64) es la densidad de empaquetamiento aleatoria para esferas equivalentes como fue calculado por Jaeger y Nagel en 1992 ⁽²⁾. (D) El divisor 24 es el número de esferas equivalentes que podrían entrar en contacto con un objeto similar en un espacio de 4 dimensiones "el número de Newton." ⁽³⁾

- 45 Referencias

⁽¹⁾ Jin, Jianjian, et.al., Simplified Procedimiento of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas- Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr; 35(3): 283-292.

⁽²⁾ Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20;255(5051):1523-31.

⁽³⁾ O. R. Musin (2003). "The problem of the twenty-five spheres". Russ. Math. Surv. 58 (4): 794-795.

EJEMPLO 25: ESTUDIOS DE ATRIBUTOS CLAVE DE CALIDAD PARA EL PRODUCTO TIL

Antecedentes

5 La terapia adoptiva de células T con linfocitos infiltrantes de tumores autólogos (TIL) ha demostrado eficacia clínica en pacientes con melanoma metastásico y otros tumores¹⁻³.

La mayoría de los informes de estudios clínicos han incluido análisis exploratorios de los productos TIL infundidos con la intención de identificar atributos de calidad como esterilidad, identidad, pureza y potencia que podrían relacionarse con la eficacia y/o seguridad del producto.^{4,5}

10 Aquí presentamos la evaluación de tres parámetros clave de producto, del producto TIL, que pueden contribuir a una futura plataforma de control de calidad para su uso en la fabricación comercial de TIL.

Descripción general del procedimiento de terapia TIL

1. El tumor fue extirpado del paciente y transportado a las instalaciones de fabricación con GMP.

2. A su llegada, el tumor se fragmenta y se coloca en matraces con IL-2 para un Protocolo de Expansión Rápida (REP).

15 3. Se propagaron adicionalmente pre-REP TIL en un protocolo REP en presencia de PBMC irradiadas, anticuerpo anti-CD3 (30 ng/mL) e IL-2 (3000 UI/ml).

4. Los productos TIL se evaluaron para determinar los atributos de calidad críticos que incluyen: (1) Identidad (2) Pureza y (3) Potencia.

20 5. Antes de la infusión de TIL expandido (LN-144), el paciente recibió un régimen de linfodepleción no mieloablativa que consistía en ciclofosfamida y fludarabina. Después de la infusión de TIL, los pacientes recibieron una duración corta (hasta 6 dosis) de IL-2 en dosis altas (600,000 UI/kg) para apoyar el crecimiento y el injerto de TIL transferido.

Objetivos del estudio

25 **Objetivo:** caracterizar completamente los productos TIL en cuanto a identidad, pureza y potencia, y por lo tanto (a) orientar la definición de atributos de calidad críticos y (b) apoyar el establecimiento de criterios formales de liberación que se implementarán en la producción comercial de productos TIL.

30 **Estrategia:** Desarrollar las siguientes metodologías analíticas para apoyar la caracterización del producto TIL. En particular, se realizaron los siguientes procedimientos: análisis fenotípico por citometría de flujo para una evaluación de identidad y pureza, ensayo de detección de células tumorales residuales para una medida de pureza y ensayo de liberación de interferón gamma para evaluar la potencia.

Materiales y procedimientos

Identidad y Pureza

35 **Caracterización fenotípica:** los productos TIL se tiñeron con anticuerpos anti-CD45, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4, anti-CD45RA, anti CCR7, anti CD62L, anti-CD19, anti-CD16 y anti-CD56 y se analizaron por citometría de flujo para la cuantificación de subconjuntos de células T y no T.

Pureza

40 **Ensayo de detección de tumores residuales:** los productos TIL se tiñeron con anticuerpos anti-MCSP (sulfato de condroitina proteoglicano asociado a melanoma) y anti-CD45, así como un colorante Aqua fijable Viva/Muerta, luego fueron analizados por citometría de flujo para la detección de células de melanoma. Se utilizaron controles enriquecidos para evaluar la precisión de la detección de tumores y para establecer criterios de activación para el análisis de datos.

Potencia

45 **Ensayo de liberación de IFN γ :** los productos TIL se reestimularon con perlas recubiertas con anti-CD3/CD28/CD137 durante 18 a 24 horas, después de lo cual se recogieron los sobrenadantes para evaluar la secreción de IFN γ usando un ensayo ELISA.

Resultados

Identidad: La mayoría (> 99%) del producto TIL de melanoma estaba compuesto por células CD45⁺CD3⁺

Las Figuras 86A-86C proporcionan una caracterización fenotípica de productos TIL usando un ensayo de citometría de flujo de 10 colores. (A) El porcentaje de subconjuntos de células T y no células T se definió mediante CD45⁺CD3⁺ y CD45⁻(no linfocitos) /CD45⁺CD3⁺(linfocitos no T), respectivamente. En general, > 99% de los productos TIL probados consistieron en células T (CD45⁺CD3⁺). Se mostró un promedio de productos TIL (n=10). (B) Porcentaje de dos subconjuntos de células T que incluyen CD45⁺ CD3⁺CD8⁺ (círculo abierto azul) y CD45⁺CD3⁺CD4⁺ (círculo abierto rosa). No se observó ninguna diferencia estadística en el porcentaje de ambos subconjuntos utilizando la prueba T para datos no apareados de Student (P=0.68). (C) La población que no es de células T se caracterizó por cuatro subconjuntos diferentes que incluyen: 1) No linfocitos (CD45⁻), 2) Células NK (CD45⁺CD3⁻CD16⁺/56⁺), 3) Célula B (CD45⁺CD19⁺), y 4) Célula no NK/B (CD45⁺CD3⁻CD16⁻CD56⁻CD19⁻).

Identidad: la mayoría del producto TIL de melanoma exhibió un fenotipo de células T efectoras o de memoria, asociado con la función citotóxica de las células T.

Las Figuras 87A y 87B muestran la caracterización de subconjuntos de células T en poblaciones de células CD45⁺CD3⁺CD4⁺ y CD45⁺CD3⁺CD8⁺. Los subconjuntos de células T naives, de memoria central (TCM), memoria efectora (TEF) y memoria efectora RA⁺(EMRA) se definieron utilizando CD45RA y CCR7. Las Figuras 87A y 87B muestran subconjuntos de células T representativos de 10 productos TIL finales en poblaciones de células CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B). El subconjunto de células T de memoria efectora (círculo azul abierto) fue una población importante (> 93%) en ambos subconjuntos CD4⁺ y CD8⁺ del producto final TIL. Menos del 7% de las células de productos TIL eran un subconjunto de memoria central (círculo abierto rosa). Los subconjuntos EMRA (círculo gris abierto) y naive (círculo negro abierto) apenas se detectaron en el producto TIL (<0.02%). Los valores p representan la diferencia entre EM y CM utilizando la prueba T para datos no apareados de Student.

Pureza: MCSP representa un marcador de tumor de melanoma apropiado para el ensayo de pureza.

Las Figuras 88A y 88B muestran la detección de la expresión de MCSP y EpCAM en células tumorales de melanoma. Se generaron líneas de células tumorales de melanoma (WM35, 526 y 888), líneas celulares de melanoma derivadas de pacientes de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento (1028, 1032 y 1041) y una línea celular de carcinoma de adenoma colorrectal (HT29 como control negativo) se caracterizaron por tinción para marcadores MCSP (proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma) y EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales). (A) El promedio del 90% de las células tumorales de melanoma expresaron MCSP. (B) La expresión de EpCAM no se detectó en líneas de células tumorales de melanoma en comparación con el control positivo HT29, una línea de células tumorales EpCAM⁺.

Pureza: Desarrollo de un ensayo basado en citometría de flujo para la detección de células tumorales residuales en productos TIL.

Las Figuras 89A y 89B ilustran la detección de controles enriquecidos para la determinación de la precisión de detección de tumores. El ensayo se realizó agregando cantidades conocidas de células tumorales en suspensiones de PBMC (n=10). Se diluyeron células tumorales de melanoma MCSP+526 en relaciones de 1:10, 1:100 y 1:1.000, luego se mezclaron con PBMC y se tiñeron con anticuerpos anti-MCSP y anti-CD45 y colorante vivo/muerto y se analizaron por citometría de flujo. (A) Se detectaron alrededor de 3000, 300 y 30 células en la dilución de 1:10, 1:100 y 1:1000, respectivamente. (B) Se utilizó un promedio (AV) y una desviación estándar (DE) de las células adquiridas en cada condición para definir los límites de referencia superior e inferior.

Pureza: Calificación del ensayo de detección de tumores residuales utilizando controles enriquecidos

Las Figuras 90A y 90B muestran el estudio de repetibilidad de los límites superior e inferior en controles enriquecidos. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado para determinar la repetibilidad del ensayo de adición. (A) El número de células tumorales detectadas por MCSP⁺ estaba constantemente dentro del intervalo de los límites de referencia superior e inferior. (B) El gráfico de regresión lineal demuestra la correlación entre las células MCSP⁺ y las diluciones de adición (R²=0.99) con la línea sólida negra que muestra el mejor ajuste. Las líneas discontinuas verdes y grises representan los límites de predicción del 95% en la curva estándar y las muestras (Exp. No. 1 a 3), respectivamente.

Pureza: los contaminantes de células tumorales de melanoma estaban por debajo de los límites de detección del ensayo en el producto TIL final.

Las Figuras 91A y 91B muestran la detección de tumor de melanoma residual en productos TIL. Los productos TIL se evaluaron para determinar la contaminación residual del tumor usando el ensayo desarrollado (n=15). La mediana del número y el porcentaje de eventos detectables de MCSP⁺ fue 2 y 0.0002%, respectivamente.

Potencia: la secreción de IFN γ por TIL (consistentemente> 1000 pg/ml) demostró la función efectora del producto TIL.

La Figura 92 muestra la evaluación de la potencia de los productos TIL después de la activación de las células T. Secreción de IFN γ después de la reestimulación con anti-CD3/CD28/CD137 en productos TIL evaluados por ELISA por duplicado (n=5). La secreción de IFN γ por los productos TIL fue significativamente mayor que los controles no estimulados usando la prueba de intervalo con signo de Wilcoxon (P=0.02), y consistentemente > 1000 pg/ml. La secreción de IFN γ >200 pg/ml se consideró potente. Un valor de p <0.05 se considera estadísticamente significativo.

Conclusión

Se evaluaron los parámetros clave del producto de identidad, pureza y potencia de los productos TIL. Los productos TIL fabricados de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento consistían en más del 99% de células T CD45+CD3+. La mayoría de los subconjuntos de TIL CD4+ y CD8+ exhibieron un fenotipo de memoria efectora, asociado con la función citotóxica de las células T. Se desarrolló y calificó con éxito un ensayo basado en citometría de flujo para detectar células tumorales de melanoma contaminantes en el producto final de TIL. Aplicando este ensayo, se demostró que las células tumorales de melanoma contaminantes en el producto TIL final estaban por debajo de los límites de detección del ensayo. La secreción de IFN γ por el producto TIL final después de la reestimulación anti-CD3/CD28/CD137 puede servir como ensayo de potencia para TIL fabricado comercialmente. Estos datos proporcionan la base de una plataforma de control de calidad que respaldará un mayor desarrollo de los atributos de calidad críticos para la producción comercial de productos TIL.

EJEMPLO 26: UN PRODUCTO DE TIL CRIOCONSERVADO GENERADO CON UN PROCEDIMIENTO ABREVIADO ADECUADO PARA LA FABRICACIÓN COMERCIAL DE ALTO RENDIMIENTO EXHIBE ATRIBUTOS DE CALIDAD FAVORABLES PARA LA TRANSFERENCIA DE CÉLULAS ADOPTIVAS

Antecedentes

Los procedimientos clásicos de generación de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para transferencia de células adoptivas (ACT) implican múltiples etapas de incubación ex vivo para producir un producto de infusión fresco (no crioconservado).

El procedimiento de primera generación (Gen 1) produjo una dosis de TIL fresco en alrededor de 6 semanas. Se desarrolló un procedimiento de fabricación de TIL de segunda generación (Gen 2) que abrevia la duración del cultivo ex vivo a 22 días (Figura 93).

El procedimiento Gen 2 es adecuado para la fabricación centralizada y produce un producto de infusión de TIL crioconservado que brinda comodidad en la programación, logística y entrega a los sitios clínicos. El producto de infusión de TIL crioconservado para LN-144 producido por el procedimiento Gen 2 tiene atributos de calidad comparables al producto de infusión de TIL no crioconservado para TIL generado por el procedimiento Gen 1. El procedimiento de fabricación de TIL Gen 2 representa un procedimiento de producción de célula flexible, robusto, cerrado y semiautomático que se adapta a la fabricación de TIL de alto rendimiento a escala comercial.

Objetivo del estudio

Se evaluaron los productos de infusión de TIL generados por los procedimientos de fabricación de Gen 1 y Gen 2 para determinar la comparabilidad en términos de los siguientes atributos de calidad: (1) Recuento de células (dosis), viabilidad, tasa de crecimiento de la fase REP, (2) pureza de células T y expresión fenotípica de moléculas coestimuladoras en subconjuntos de células T, (3) Longitud relativa promedio de las repeticiones de telómeros, (4) Capacidad para secretar IFN γ en respuesta al acoplamiento de CD3, CD28, CD137 y (5) Diversidad de receptores de células T presentes en el producto de infusión final (Figura 94).

Procedimientos analíticos e instrumentación

Recuento de células y viabilidad: se tomaron muestras de los productos de infusión formulados finales y se analizaron las células nucleadas totales, las células viables totales y la viabilidad fue determinada mediante tinción de naranja de acridina/DAPI usando el contador celular automático NC-200. Los lotes de desarrollo del procedimiento se ensayaron en el contador de viabilidad celular Nexcellom Cellometer K2 usando tinción fluorescente dual con naranja de acridina/yodo de propidio.

Marcadores fenotípicos: se tomaron muestras de los productos de infusión formulados y se ensayó su identidad mediante tinción inmunofluorescente. El porcentaje de células T se determinó como la población de células viables CD45+, CD3+ (doble positiva). Los viales satélite o centinela congelados para cada procedimiento se descongelaron y se analizaron en busca de marcadores fenotípicos extendidos, incluidos CD3, CD4, CD8, CD27 y CD28. Los productos de infusión frescos se adquirieron en el BD FACS Canto II, y los marcadores fenotípicos extendidos en los productos de infusión descongelados se adquirieron en el analizador de células Bio-Rad ZE5.

Longitud relativa promedio de las repeticiones de los telómeros: se utilizó la tecnología Flow-FISH para medir la longitud promedio de las repeticiones de los telómeros. Este ensayo se completó como se describe en el protocolo DAKO® Telomere PNA Kit/FITC para citometría de flujo. Brevemente, 2.0×10^6 células TIL se combinaron con 2.0×10^6 células T de leucemia de la línea celular humana (1301). El ADN se desnaturalizó a 82°C durante 10 minutos y la sonda PNA-FITC se hibridó en la oscuridad durante la noche a temperatura ambiente. Se utilizó yoduro de propidio para identificar las células en la fase G0/1.

Función inmunológica: se midió la capacidad del producto de infusión para secretar IFN γ tras la reactivación después de un cocultivo con perlas recubiertas de anticuerpo (Life Technologies, anti-CD3, anti-CD28 & anti-CD137). Después de 24 horas, los sobrenadantes del cultivo se recolectaron, congelaron, descongelaron y ensayaron mediante ELISA usando el kit Quantikine IFN γ ELISA (sistemas de R&D) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Diversidad del receptor de células T: se aisló el ARN de los productos de infusión y se sometió a una PCR multiplex con cebadores específicos de VDJ. Las secuencias de CDR3 expresadas en el producto de TIL se amplificaron semicuantitativamente y se secuenciaron en profundidad para determinar la frecuencia y prevalencia de clones de TIL únicos. La secuenciación se realizó en el secuenciador de sobremesa Illumina MiSeq. Los valores se indexaron para producir una clasificación representativa de la diversidad relativa de receptores de células T en el producto.

Resultados

El día 22, el producto celular de volumen reducido se combinó y se tomaron muestras para determinar el rendimiento del cultivo antes del lavado y la formulación. Las Figuras 95A-95C muestran células viables totales, tasa de crecimiento y viabilidad. (A) Las muestras se analizaron en el contador de células automatizado NC-200 como se describió anteriormente. La densidad de células viables total se determina mediante la gran media de recuentos duplicados de 4 muestras independientes. El procedimiento de Gen 2 produjo un producto TIL de dosis similar a Gen 1 (media de Gen 1 = $4.10 \times 10^{10} \pm 2.8 \times 10^{10}$, media de Gen 2 = $4.12 \times 10^{10} \pm 2.5 \times 10^{10}$). (B) La tasa de crecimiento se calculó para la fase REP como. (C) La viabilidad celular se evaluó a partir de 9 lotes de desarrollo de procedimientos utilizando el Cellometer K2 como se describió anteriormente. No se observó una disminución significativa en la viabilidad celular después de un único ciclo de congelación-descongelación del producto formulado. La reducción media de la viabilidad tras el deshielo y el muestreo fue del 2.19%.

Las Figuras 96A-96C muestran que los productos Gen 2 son cultivos de células T altamente puros que expresan moléculas coestimuladoras a niveles comparables a los de Gen 1. (Figura 96A) Se ensayó la identidad de productos farmacéuticos recién formulados mediante citometría de flujo para su liberación. Los procedimientos de Gen 1 y Gen 2 producen cultivos de células T de alta pureza según lo definido por el fenotipo CD45+, CD3+ (doble positivo). (Figuras 96B y 96C) Se descongelaron viales satélite crioconservados de producto farmacológico formulado y se ensayó el fenotipo extendido mediante citometría de flujo como se describió previamente. Los productos Gen 1 y Gen 2 expresaron niveles similares de moléculas coestimuladoras CD27 y CD28 en subconjuntos de células T. Es posible que se requieran moléculas coestimuladoras como CD27 y CD28 para suministrar la señalización secundaria y terciaria necesaria para la proliferación de células efectoras tras el acoplamiento del receptor de células T. El valor de p se calculó utilizando la prueba 't' de Mann-Whitney.

La Figura 97 muestra que los productos Gen 2 tienden hacia un telómero relativo más largo. Longitudes. La tecnología Flow-FISH se utilizó para medir la longitud promedio de la repetición de los telómeros como se describió anteriormente. El valor RTL indicó que la fluorescencia media de los telómeros por cromosoma/genoma en Gen 1 fue del $7.5\% \pm 2.1\%$, y Gen 2 fue del $8.4\% \pm 1.8\%$ de la fluorescencia del telómero por cromosoma/genoma en la línea de células de control (línea celular de leucemia 1301). Los datos indican que los productos Gen 2 tienen, en promedio, longitudes de telómero comparables a las de los productos Gen 1. La longitud de los telómeros es una medida sustituta de la longitud del cultivo celular ex vivo.

La Figura 98 muestra que los productos farmacológicos Gen 2 secretan IFN γ en respuesta al acoplamiento de CD3, CD28 y CD137. Los productos farmacológicos crioconservados se descongelaron y se incubaron con perlas recubiertas de anticuerpo como se describió anteriormente. Los datos se expresan como la cantidad de IFN γ producida por 5×10^5 células viables en 24 horas. Los productos farmacéuticos Gen 2 mostraron una mayor capacidad para producir IFN γ tras la reactivación en relación con los productos farmacéuticos Gen 1. La capacidad del fármaco para reactivarse y secretar citocinas es una medida sustituta de la función in vivo tras la unión del TCR al antígeno similar en el contexto de HLA.

Las Figuras 99A y 99B muestran que los productos farmacológicos Gen 2 tienen una mayor diversidad de receptores únicos de células T. La diversidad del receptor de células T se evaluó como sigue. Se ensayó el ARN de 10×10^6 TIL de los productos de infusión de Gen 1 y Gen 2 para determinar el número total y la frecuencia de secuencias de CDR3 únicas presentes en cada producto. (Figura 99A) Se indexaron secuencias únicas de CDR3 en relación con la frecuencia en cada producto para producir una clasificación representativa de la diversidad global de receptores de células T en el producto. (Figura 99B) El número total promedio de

secuencias de CDR3 únicas presentes en cada producto de infusión. Los productos TIL de ambos procedimientos se componían de poblaciones policlonales de células T con diferentes especificidades y avidez de antígenos. La amplitud del repertorio total de células T puede ser indicativa del número de epítomos procesables presentados en las células tumorales.

5 Conclusiones

El procedimiento de fabricación de Gen 2 produjo un producto de infusión de TIL (LN-144) con atributos de calidad comparables a los de Gen 1. Gen 2 produjo dosis similares de TIL de alta pureza. Los subconjuntos de células T estaban en proporciones similares y expresaron moléculas coestimuladoras en niveles comparables de Gen 1. Gen 2 TIL tendió hacia una longitud relativa más larga de los telómeros proporcional al período de cultivo ex vivo reducido. TIL Gen 2 mostró una mayor diversidad de receptores de TCR que, cuando se activaron, iniciaron una secreción robusta de IFN- γ , una medida de la función efectora citolítica. Por lo tanto, el procedimiento de expansión cerrado de 22 días abreviado de Gen 2, con producto de infusión crioconservado, presenta una plataforma de fabricación de TIL escalable y logísticamente factible que permite la generación rápida de dosis a escala clínica para pacientes con cáncer que necesitan de inmediato una nueva opción de terapia.

Referencias

- 1 Dudley, M. E. et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23, 2346-2357, doi:10.1200/JCO.2005.00.240 (2005).
- 20 2 Chandran, S. S. et al. Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*, doi:10.1016/S1470-2045(17)30251-6 (2017).
- 3 Stevanovic, S. et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirustargeted tumor-infiltrating T cells. *J Clin Oncol* 33, doi:10.1200/jco.2014.58.9093 (2015).
- 25 4 FDA Reviewers and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs), 21 CFR 610.3(r), 2008.
- 5 Richards JO, Treisman J, Garlie N, Hanson JP, Oaks MK. Flow cytometry assessment of residual melanoma cells in tumor-infiltrating lymphocyte cultures. *Cytometry A* 2012; 81:374-81.

EJEMPLO 27: EL CÓCTEL DE FACTOR DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS T IL-2/IL-15/IL-21 MEJORÓ LA FUNCIÓN DE EXPANSIÓN Y EFECTORA DE LAS CÉLULAS T INFILTRANTES DE TUMORES EN UN NUEVO PROCEDIMIENTO DESCRITO AQUÍ

Antecedentes

La terapia de células T adoptivas con TIL autólogos ha demostrado eficacia clínica en pacientes con melanoma metastásico y carcinoma cervical. En algunos estudios, los mejores resultados clínicos se han correlacionado positivamente con la cantidad total de células infundidas y/o el porcentaje de células T CD8+. La mayoría de los regímenes de producción actuales utilizan únicamente IL-2 para promover el crecimiento de TIL. Se ha informado una mayor expansión de linfocitos utilizando regímenes que contienen IL-15 e IL-21. Este estudio describe los efectos positivos y las sinergias de la adición de IL-15 e IL-21 a las formas de realización del procedimiento 2A y los procedimientos de fabricación de TIL de generación 2.

40 Generación de TIL usando un procedimiento nuevo descrito en este documento

El tumor se extirpa del paciente y se transporta a la instalación de fabricación con GMP o un laboratorio con fines de investigación. A su llegada, el tumor se fragmenta y se coloca en matraces con IL-2 para el protocolo de expansión previa (pre-REP) durante 11 días. Para los estudios de triple cóctel, se agregan IL-2, IL-15 e IL-21 (IL-2/IL-15/IL-21) al inicio del pre-REP. Para el Protocolo de expansión rápida (REP), se cultivan TIL con alimentadoras y anticuerpo anti-CD3 durante 11 días adicionales (Figura 100).

Materiales y procedimientos

El procedimiento de generación de TIL incluyó un protocolo de expansión previa rápida (pre-REP), en donde se colocaron fragmentos tumorales de 1-3 mm³ de tamaño en medio que contenía IL-2. Durante el pre-REP, TIL emigró de los fragmentos tumorales y se expandió en respuesta a la estimulación de IL-2.

50 Para estimular aún más el crecimiento de TIL, los TIL se expandieron durante un período de cultivo secundario denominado Protocolo de Expansión Rápida (REP) que incluía alimentadoras de PBMC irradiadas, IL-2 y anticuerpo anti-CD3. Se desarrolló un protocolo de expansión pre-REP y REP abreviado para expandir TIL mientras se mantenían los atributos fenotípicos y funcionales del producto TIL final. Este protocolo de

generación de TIL abreviado se utilizó para evaluar el impacto de IL-2 sola frente a una combinación de IL-2/IL-15/IL-21 añadida a la etapa pre-REP. Estos dos regímenes de cultivo se compararon para la generación de TIL cultivada a partir de tumores colorrectales, melanomas, cervicales, de mama triple negativo, pulmón y renales. Al finalizar el pre-REP, se evaluó la expansión, el fenotipo, la función (CD107a+ e IFN γ) y el repertorio de TCR V β de TIL cultivados.

El estudio muestra una mejora en la expansión durante el pre-REP con IL-2/IL-15/IL-21 en múltiples histologías tumorales. Los cultivos pre-REP se iniciaron utilizando el protocolo estándar de IL-2 (6000 UI/ml) o con IL-15 (180 UI/ml) e IL-21 (1 UI/ml) además de IL-2 (Figura 101). Se evaluó la expansión de las células al completar el pre-REP. Un cultivo se clasificó como con mayor expansión sobre la IL-2 si el crecimiento general se incrementó en al menos un 20%. Los estudios fenotípicos y funcionales del melanoma y del pulmón se analizan con más detalle en los siguientes párrafos (texto en negrita en la Figura 101).

La IL-2/IL-15/IL-21 aumentó el porcentaje de células CD8+ en el carcinoma de pulmón, pero no en el melanoma. En las Figuras 102A y 102B, TIL derivado de (A) melanoma (n=4) y (B) pulmón (n=7) se evaluaron fenotípicamente para células CD4+ y CD8+ usando citometría de flujo post pre-REP. El valor p representa la diferencia entre las condiciones de IL-2 e IL-12/IL-15/IL-21 utilizando la prueba t para datos no apareados de Student.

La expresión de CD27 mejoró ligeramente en células CD8+ en cultivos tratados con IL-2/IL-15/IL-21. En las Figuras 103A y 103B, los TIL derivados de (A) melanoma (n=4) y (B) pulmón (n=7) se evaluaron fenotípicamente para CD27+ y CD28+ en las células CD4+ y CD8+ usando citometría de flujo post pre-REP. La expresión de CD27, un marcador celular asociado con un fenotipo más joven que se ha correlacionado con los resultados de la terapia de células T adoptivas, mejoró ligeramente en CD8+ TIL derivados de cultivo con IL-2/IL-15/IL-21 frente a IL-2 sola.

Los subconjuntos de células T no se alteraron con la adición de IL-15/IL-21. En las Figuras 104A y 104B, los TIL se evaluaron fenotípicamente para los subconjuntos efector/memoria (CD45RA y CCR7) en las células CD8+ y CD4+ (datos no mostrados) de (A) melanoma (n=4) y (B) pulmón (n=8) mediante citometría de flujo post-REP. TEM=memoria efectora (CD45RA-, CCR7-), TCM=memoria central (CD45RA-, CCR7+), TSCM=memoria de células madre (CD45RA+, CCR7+), TEMRA=células T efectoras (CD45RA+ CCR7-).

La capacidad funcional de los TIL se mejoró diferencialmente con IL-2/IL-15/IL-21. En las Figuras 105A y 105B, se evaluó la expresión de CD107a+ de los TIL derivados de (A) melanoma (n=4) y (B) pulmón (n=5) en respuesta a la estimulación de PMA durante 4 horas en las células CD4+ y CD8+, por citometría de flujo. (C) Se estimularon los TIL pre-REP derivados de melanoma y pulmón durante 24 horas con anticuerpo anti-CD3 soluble y se evaluó el IFN γ en los sobrenadantes mediante ELISA.

La frecuencia relativa del repertorio de TCRV β se alteró en respuesta a IL-2/IL-15/IL-21 en el pulmón, pero no en el melanoma. En las Figuras 106A y 106B, se evaluó el repertorio de TCRV β (24 especificidades) en los TIL derivados de un (A) melanoma y (B) tumor de pulmón usando el kit Beckman Coulter para citometría de flujo.

Resumen

Este trabajo demuestra la capacidad del cóctel IL-2/IL-15/IL-21 para mejorar los números de TIL en comparación con IL-2 sola (> 20%) en el procedimiento de Generación 2, además de impactar las características fenotípicas y funcionales.

El efecto del cóctel triple sobre la expansión de TIL dependía de la histología. La relación de células T CD8+/CD4+ aumentó con la adición de IL-2/IL-15/IL-21 en tumores de pulmón. La adición de IL-15 e IL-21 aumentó la expresión de CD107a y la producción de IFN γ en TIL derivados de tumores pulmonares. La adición de IL-2/IL-15/IL-21 alteró el repertorio de TCRV β en el pulmón. El procedimiento de expansión de TIL de Generación 2 se utilizó para abarcar el cóctel de citocinas IL-2/IL-15/IL-21, proporcionando así un medio para promover aún más la expansión de TIL en histologías tumorales específicas, como tumores pulmonares y colorrectales. Estas observaciones son especialmente relevantes para la optimización y estandarización de los regímenes de cultivo de TIL necesarios para la fabricación a gran escala de TIL con la amplia aplicabilidad y disponibilidad requeridas de una terapia contra el cáncer de corriente principal.

EJEMPLO 28: NUEVOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR CRIOCONSERVADOS (LN-144) ADMINISTRADOS A PACIENTES CON MELANOMA METASTÁSICO. EFICACIA Y TOLERABILIDAD DEMOSTRADAS EN UN ENSAYO CLÍNICO MULTICENTRO FASE 2

Antecedentes

La seguridad y eficacia de la terapia celular adoptiva (ACT) que utiliza linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) se ha estudiado en cientos de pacientes con melanoma metastásico y ha demostrado tasas de respuesta objetiva (TRO)¹ significativas y duraderas. En un ensayo de fase 2 en curso, C-144-01 que utiliza la fabricación

centralizada con GMP de TIL, se evaluaron tanto los procedimientos de fabricación de TIL de Generación 1 (Gen 1) no criopreservados como los de Generación 2 (Gen 2) criopreservados.

Gen 1 tiene alrededor de 5-6 semanas de duración de fabricación (administrado en la Cohorte 1 del estudio C-144-01), mientras que Gen 2 tiene 22 días de duración de fabricación (procedimiento 2A, administrado en Cohorte 2 de estudio C-144-01). Los datos preliminares de los pacientes de la Cohorte 1 infundidos con el producto fabricado Gen 1 LN-144 fueron alentadores en el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico post-PD-1 ya que la terapia TIL produjo respuestas.² Los beneficios de Gen 2 incluyeron: (A) reducción en el tiempo que los pacientes y los médicos esperan para infundir TIL al paciente; (B) la criopreservación permite flexibilidad en la programación, distribución y entrega; y (C) reducción de los costes de fabricación. Los datos preliminares de la Cohorte 2 se presentan en este documento. La Figura 107 muestra una forma de realización del procedimiento de fabricación de LN-144 criopreservado Gen 2 (procedimiento 2A).

Diseño de estudio: Ensayo de fase 2 C-144-01 en melanoma metastásico

Estudio de fase 2, multicéntrico, de 3 cohortes para evaluar la eficacia y seguridad de linfocitos infiltrantes de tumores autólogos (LN-144) para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico.

Criterios de inclusión clave: (1) Melanoma metastásico medible y ≥ 1 lesión extirpable para la generación de TIL; (2) Progresión en al menos una línea previa de terapia sistémica; (3) Edad ≥ 18 ; y (4) ECOG PS 0-1.

Cohortes de tratamiento: (1) producto LN-144 no criopreservado; (2) producto LN-144 criopreservado; y (3) Re-tratamiento con LN-144 para pacientes sin respuesta o que progresan después de la respuesta inicial. La Figura 108 muestra el diseño del estudio.

Criterios de valoración: (1) Primario: Eficacia definida como ORR y (2) Secundario: Seguridad y eficacia.

Procedimientos

Conjunto de seguridad de la cohorte 2: 13 pacientes que se sometieron a extirpación con el propósito de generar TIL y recibieron cualquier componente del tratamiento del estudio.

Conjunto de eficacia de la cohorte 2: 9 pacientes que recibieron el precondicionamiento de NMA-LD, la infusión de LN-144 y al menos una dosis de IL-2, y tuvieron al menos una evaluación de eficacia. 4 pacientes no tenían una evaluación de la eficacia en el momento del corte de datos.

Se han mostrado datos de biomarcadores para todos los datos disponibles leídos en la fecha del corte de datos.

Resultados

La figura 109 proporciona una tabla que ilustra las características de los pacientes de comparación de la cohorte 1 (ASCO 2017) frente a la cohorte 2. La cohorte 2 tiene: 4 terapias previas medianas; todos los pacientes han recibido previamente anti-PD-1 y anti-CTLA-4; y tenía una mayor carga tumoral reflejada por una mayor suma de diámetros (SOD) para las lesiones diana y una LDH media más alta al inicio del estudio. La Figura 110 proporciona una tabla que muestra los eventos adversos emergentes del tratamiento ($\geq 30\%$).

Para la Cohorte 2 (LN-144 criopreservado), el producto de infusión y las características de la terapia TIL fueron (1) número medio de células TIL infundidas: 37×10^9 , y (2) número mediano de administraciones de dosis de IL-2 fue 4.5. La Figura 111 muestra la eficacia del producto de infusión y la terapia TIL para los pacientes # 1 a # 8.

La Figura 112 muestra el estado clínico de la respuesta de los pacientes evaluables con enfermedad estable (SD) o una mejor respuesta. No se confirmó una respuesta parcial (RP) para el Paciente 6 ya que el paciente aún no alcanzó la segunda evaluación de eficacia. Un paciente (Paciente 9) falleció antes de la primera evaluación (todavía se considera en el conjunto de eficacia).

De los 9 pacientes en el conjunto de eficacia, un paciente (Paciente 9) no fue evaluable (NE) debido a la muerte relacionada con el melanoma antes de la primera evaluación del tumor no representada en la Figura 112. Se observaron respuestas en pacientes tratados con Gen 2. La tasa de control de la enfermedad (DCR) fue del 78%. El tiempo de respuesta fue similar al de la Cohorte 1. Un paciente (Paciente 3) con enfermedad progresiva (EP) en calidad de mejor respuesta no se incluyó en el gráfico de carriles de natación.

La Figura 113 muestra el cambio porcentual en la suma de diámetros. El paciente 9 no tuvo una evaluación de la enfermedad posterior a LN-144 debido a la muerte relacionada con el melanoma antes del día 42. Día -14: % de cambio de la suma de diámetros desde el cribado hasta la línea de base (día -14). Día -14 al día 126: % de cambio de SOD desde el inicio. Día -14=Línea de base. Día 0=infusión de LN-144.

Tras el tratamiento con TIL, se observó un aumento de HMGB1 (Figura 114). Los niveles plasmáticos de HMGB1 se midieron usando el kit ELISA HMGB1 (Tecan US, Inc). Los datos mostrados representan el cambio

de veces en los niveles de HMGB1 antes (día -7) y después (día 4 y día 14) de la infusión de LN-144 en pacientes de la Cohorte 1 y Cohorte 2 (los valores de p se calcularon usando la prueba t de dos colas emparejada basada en datos log transformados). El tamaño de la muestra (en negrita y en cursiva) y los valores medios (en cursiva) se muestran entre paréntesis para cada punto en el tiempo. La HMGB1 es secretada por células inmunitarias activadas y liberada por células tumorales dañadas. Los niveles aumentados de HMGB1 observados después del tratamiento con LN-144 sugieren, por lo tanto, un mecanismo de actividad antitumoral mediado por el sistema inmunitario.

Se midieron los niveles de IP-10 en plasma usando el ensayo Luminex. Los datos que se mostraron en la Figura 115 representan el cambio de veces en los niveles de IP-10 antes (día -7) y después (día 4 y día 14) de la infusión de LN-144 en pacientes de la Cohorte 1 y Cohorte 2 (los valores de p se calcularon usando prueba t emparejada de dos colas, basada en datos transformados logarítmicamente). El tamaño de la muestra (en negrita y en cursiva) y los valores medios (en cursiva) se mostraron entre paréntesis para cada punto en el tiempo. El aumento posterior a la infusión de LN-144 en IP-10 se está monitoreando para comprender la posible correlación con la persistencia de TIL.

Los datos actualizados de la cohorte 2 (n=17 pacientes) se informan en la Figura 116 a la Figura 121. En comparación con la Cohorte 1 y una forma de realización del procedimiento Gen 1, que mostró un DCR del 64% y una tasa de respuesta general (ORR) del 29% (N=14), la Cohorte 2 y una forma de realización del procedimiento Gen 2 mostraron una DCR del 80% y ORR del 40% (N=10).

Conclusiones

Los resultados preliminares de los datos existentes demuestran una seguridad comparable entre los productos de TIL LN-144 de Gen 1 y Gen 2. La administración de TIL fabricados con el procedimiento Gen 2 (procedimiento 2A, como se describe en este documento) conduce a respuestas clínicas sorprendentemente aumentadas, observadas en pacientes con melanoma metastásico de enfermedad avanzada; todas habían progresado con terapias anteriores anti-PD-1 y anti-CTLA-4. La DCR para la cohorte 2 fue del 78%.

Los datos preliminares de biomarcadores apoyan el mecanismo de acción citolítico propuesto para la terapia con TIL.

La forma de realización del procedimiento de fabricación Gen 2 descrito en este documento dura 22 días. Este procedimiento acorta significativamente el tiempo que un paciente tiene que esperar para recibir su TIL, ofrece flexibilidad en el momento de la dosificación de los pacientes y conduce a una reducción del coste de fabricación, al tiempo que proporciona otras ventajas sobre los enfoques anteriores que permiten la comercialización y registro en las agencias reguladoras de la salud. Los datos clínicos preliminares en el melanoma metastásico utilizando una forma de realización del procedimiento de fabricación Gen 2 también indican una mejora sorprendente en la eficacia clínica de los TIL, medida por DCR, ORR y otras respuestas clínicas, con un tiempo de respuesta similar y un perfil de seguridad en comparación con TIL fabricados mediante el procedimiento Gen 1. La eficacia inesperadamente mejorada del producto TIL de Gen 2 también se demuestra por un aumento de más de cinco veces en la producción de IFN- γ (Figura 98), que se correlaciona con una eficacia mejorada en general (Figura 122), una policlonalidad significativamente mejorada (Figura 99A y Figura 99B), y una producción promedio más alta de IP-10 y MCP-1 (Figura 123 a Figura 126). Sorprendentemente, a pesar del procedimiento mucho más corto de Gen 2, muchas otras características críticas del producto TIL son similares a las observadas usando procedimientos de fabricación más tradicionales, incluida la longitud relativa de los telómeros (Figura 97) y la expresión de CD27 y CD28 (Figura 96B y Figura 96C).

Referencias

1Goff, et al. Randomized, Prospective Evaluation Comparing Intensity of Lymphodepletion Before Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Melanoma. J Clin Oncol. 2016 Jul 10;34(20):2389-97.

2Sarnaik A, Kluger H, Chesney J, et al. Efficacy of single administration of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in heavily pretreated patients with metastatic melanoma following checkpoint therapy. J Clin Oncol. 2017; 35 [suppl; abstr 3045].

50 EJEMPLO 29: ESTUDIOS DE FASE 2 DE HNSCC Y CARCINOMA CERVICAL

Inscripción para el estudio de fase 2 del HNSCC (carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; C-145-03). 13 pacientes dieron su consentimiento para el estudio, se recolectaron TIL de 10 pacientes y, finalmente, se infundió a 7 pacientes con 1 más en curso.

Inscripción en el estudio de fase 2 del carcinoma de cuello uterino (C-145-04). Ocho pacientes dieron su consentimiento para el estudio, se recolectaron TIL de 4 pacientes y finalmente se infundieron 2 pacientes y 2 más en desarrollo.

Los datos iniciales del estudio en curso se proporcionan en la Figura 127. Se observó enfermedad estable (SD) y/o respuesta progresiva tanto en pacientes con HCNSCC como en pacientes con cáncer de cuello uterino tratados con la terapia TIL hasta por 84 días.

- Los ejemplos expuestos anteriormente se proporcionan para dar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar las formas de realización de las composiciones, sistemas y procedimientos de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

Secuencias:

SEQ ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de muromonab.

- 10 SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de muromonab.

SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-2 humana recombinante.

SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de la aldesleucina.

SEQ ID NO:5 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-4 humana recombinante.

SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-7 humana recombinante.

- 15 SEQ ID NO:7 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-15 humana recombinante.

SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-21 humana recombinante. Secuencias de aminoácidos de muromonab.

Identificador	Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO:1 Cadena pesada de Muromonab	<pre> QVQLQSGYELRLVSGGGSTLQPKSLPVTHLAAISGQDNRVYV RQWFLKATQTDHSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ YVQSSSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQSVTQSTP KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ </pre>
SEQ ID NO:2 Cadena ligera de Muromonab	<pre> QVQLQSGYELRLVSGGGSTLQPKSLPVTHLAAISGQDNRVYV RQWFLKATQTDHSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ YVQSSSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQSVTQSTP KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ </pre>

Secuencias de aminoácidos de interleucinas.

Identificador	Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO:3 IL-2 recombinante humana (rhIL-2)	<pre> KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ </pre>
SEQ ID NO:4 Aldesleucina	<pre> KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ </pre>
SEQ ID NO:5 IL-4 recombinante humana (rhIL-4)	<pre> KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ </pre>
SEQ ID NO:6 IL-7 recombinante humana (rhIL-7)	<pre> KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ </pre>
SEQ ID NO:7 IL-15 recombinante humana (rhIL-15)	<pre> KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ KQVTSVNLQVQVQSTSTVQLSLTSTEDLQYVYCAARYQSVFQ </pre>

ES 3 008 832 T3

Identificador	Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO:8	<pre> MSTNTHFQ QTRFQDQK WFNQDQFF DQRTFQTH DQRTFQTP DQRTFQTH 60 MSTNTHFQ QTRFQDQK WFNQDQFF DQRTFQTH DQRTFQTP DQRTFQTH 120 MSTNTHFQ QTRFQDQK WFNQDQFF DQRTFQTH DQRTFQTP DQRTFQTH 180 </pre>
IL-21 recombinante humana (rhIL-21)	

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para expandir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende:
 - (a) agregar fragmentos tumorales procesados que comprenden una primera población de TIL de un tumor resecado de un paciente en un sistema cerrado;
 - (b) realizar una primera expansión cultivando la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión se realiza en un contenedor cerrado que proporciona una primera área superficial permeable a los gases, en donde la primera expansión se realiza durante 11 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL, y en donde la transición de la etapa (a) a la etapa (b) se produce sin abrir el sistema;
 - (c) realizar una segunda expansión suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión se realiza durante 11 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL, en donde la segunda expansión se realiza en un contenedor cerrado que proporciona una segunda área superficial permeable a los gases, y en donde la transición de la etapa (b) a la etapa (c) ocurre sin abrir el sistema y en donde las células presentadoras de antígeno se agregan a los TIL en la etapa (c) sin abrir el sistema;
 - (d) recolectar la población terapéutica de TIL obtenida de la etapa (c), en donde la transición de la etapa (c) a la etapa (d) ocurre sin abrir el sistema; y
 - (e) transferir la población de TIL recolectada de la etapa (d) a una bolsa de infusión, en donde la transferencia de la etapa (d) a la (e) ocurre sin abrir el sistema,en donde la población terapéutica de TIL recolectada en la etapa (d) comprende suficientes TIL para una dosis terapéuticamente efectiva de los TIL, y en donde el procedimiento comprende además:
 - (f) criopreservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL recolectada de la etapa (e) utilizando un proceso de criopreservación.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el procedimiento comprende, antes de la etapa (a), una etapa de obtención de la primera población de TIL de un tumor resecado de un sujeto mediante el procesamiento de una muestra de tumor obtenida del paciente en múltiples fragmentos de tumor.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde las APC son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en donde las PBMC se complementan en una relación de 1:25 TIL:PBMC.
5. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde las etapas (a) a (e) se realizan en 22 días.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el riesgo de contaminación microbiana se reduce en comparación con un sistema abierto.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL, la población de TIL recolectada y/o la población de TIL terapéutica durante ninguna de las etapas (a) a (f).
8. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la tercera población de TIL en la etapa (d) es una población terapéutica de TIL que comprende una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central en relación con la segunda población de TIL, en donde las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas en la población terapéutica de TIL presentan una o más características seleccionadas del grupo que consiste en expresar CD27+, expresar CD28+, telómeros más largos, expresión aumentada de CD57 y expresión disminuida de CD56 en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células.

Procedimiento 2A- procedimiento de 22 días, 2-3 días de recolección/envío

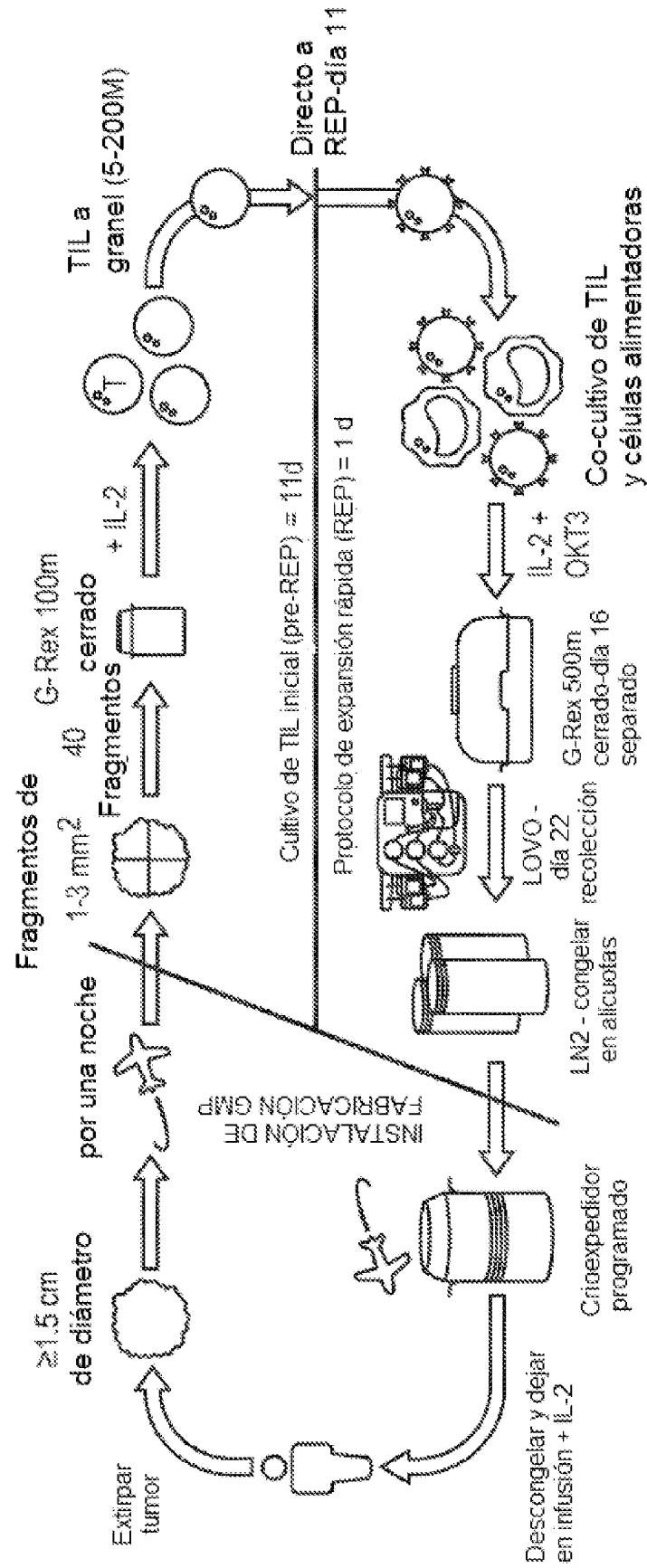


Figura 1

Desarrollo del procedimiento

Etapa	Procedimiento actual-1C	Nuevo procedimiento-2A	Impacto
1	4 Fragmentos/10 G-Rex 10-21 días	40 Fragmentos/1-G-Rex 100 CS-(x2?) 11 días	Incrementa muestra de tumor/ contenedor, abrevia cultivo, reduce etapas, dispuesta a sistema cerrada
2	Congelar preREP-> ensayar->descongelar ~ día 27 >40e6TIL	Directo a REP - día 11- <200e6	Abrevia procedimiento, reduce etapas, elimina ensayos
3	36 G-Rex 100--día 36 >5e6TIL - separado-día 36	4-5 G-Rex 500CS- TIL - separado día 16	Reduce etapas, sistema cerrado, REP más breve
4	Recolección día ~43 + recolección por centrifugación	Recolección día 22 LOVO-lavador de células automático	Reduce etapas, sistema cerrado, automático
5	Producto fresco- HypoThermosol- bolsa de infusión individual	Producto crioconservado -CS10 en LN ₂ alícuotas múltiples	Flexibilidad de envío, programación de paciente, ensayos de liberación más fáciles, ensayos globales
6	Tiempo de procedimiento día 43+	Tiempo de procedimiento día 22	Giro radical para el paciente, rendimiento de sala limpia, COGs

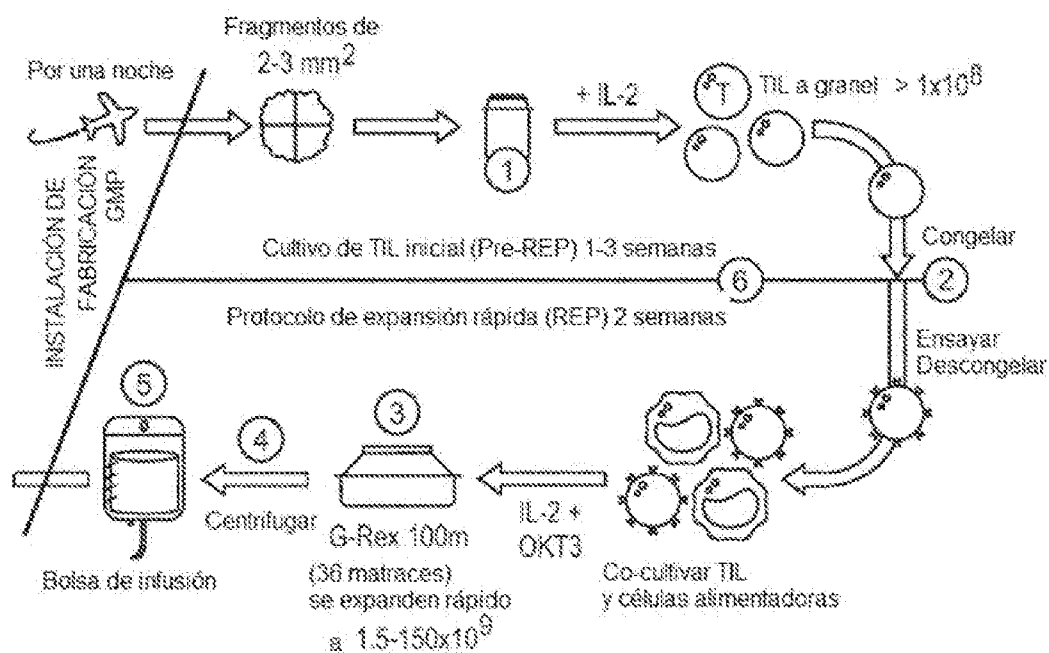


Figura 2

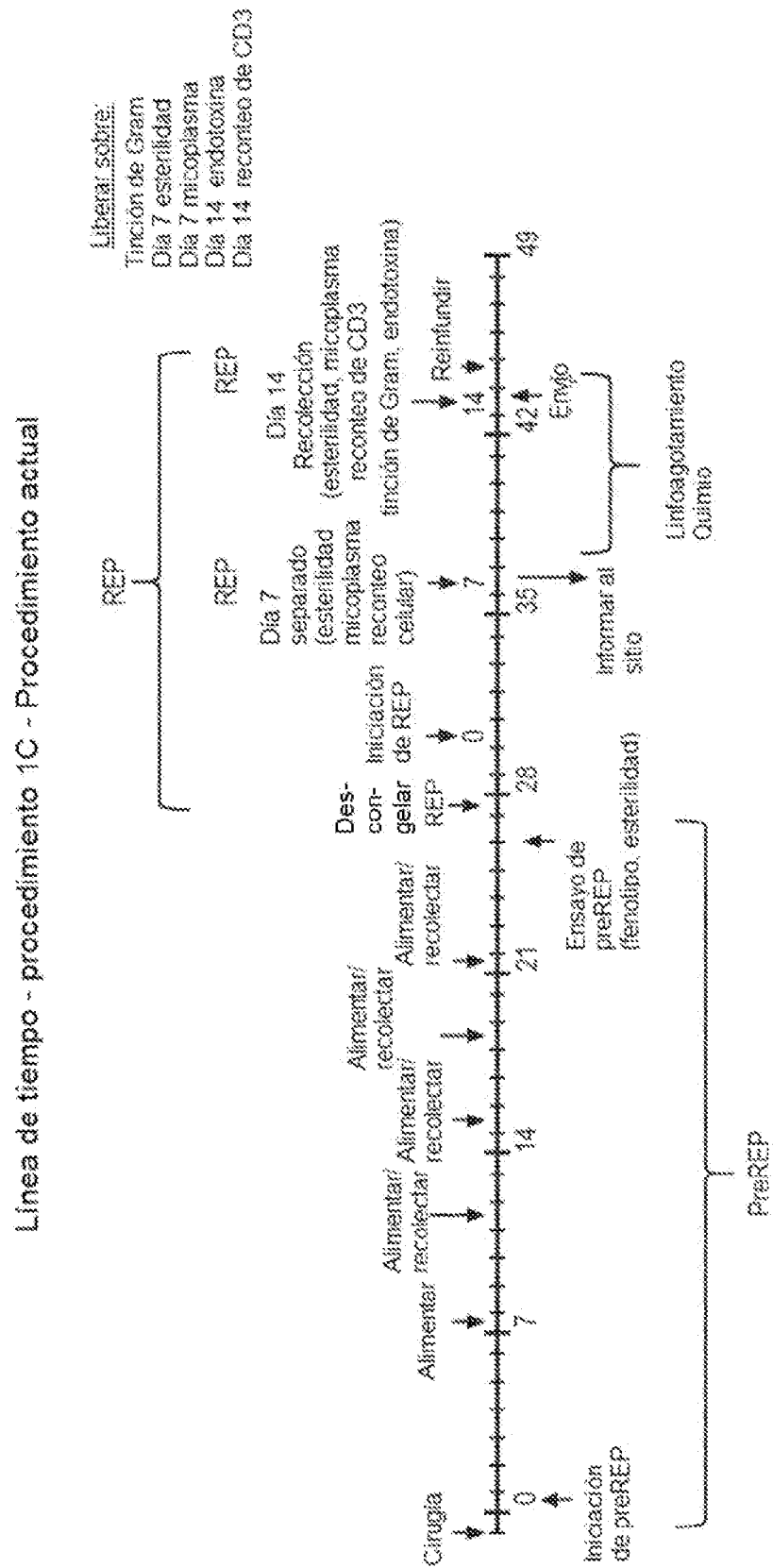


Figura 3

Línea de tiempo de terapia TIL-v2A-día 16 REP >250e6

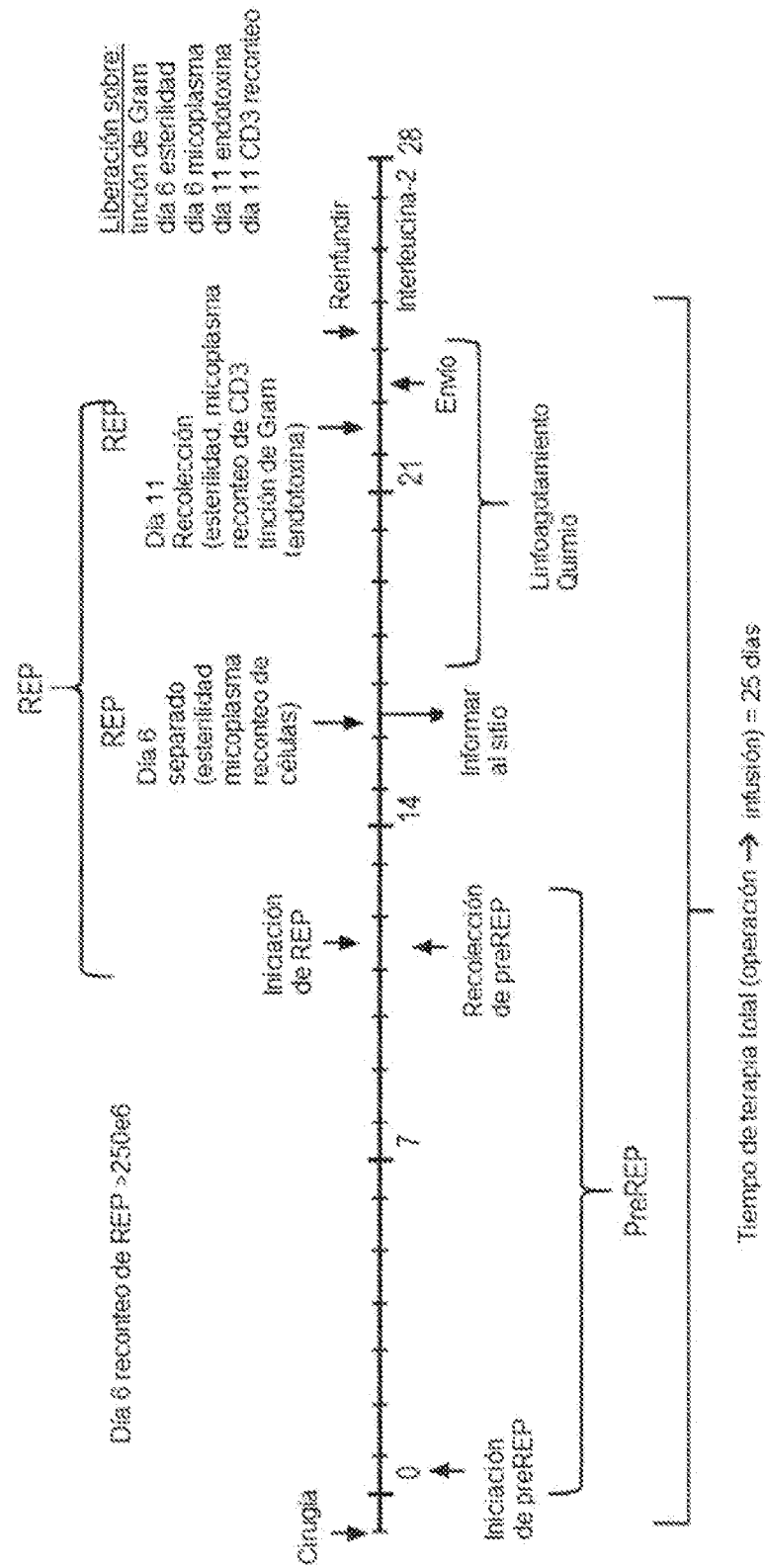


Figura 4

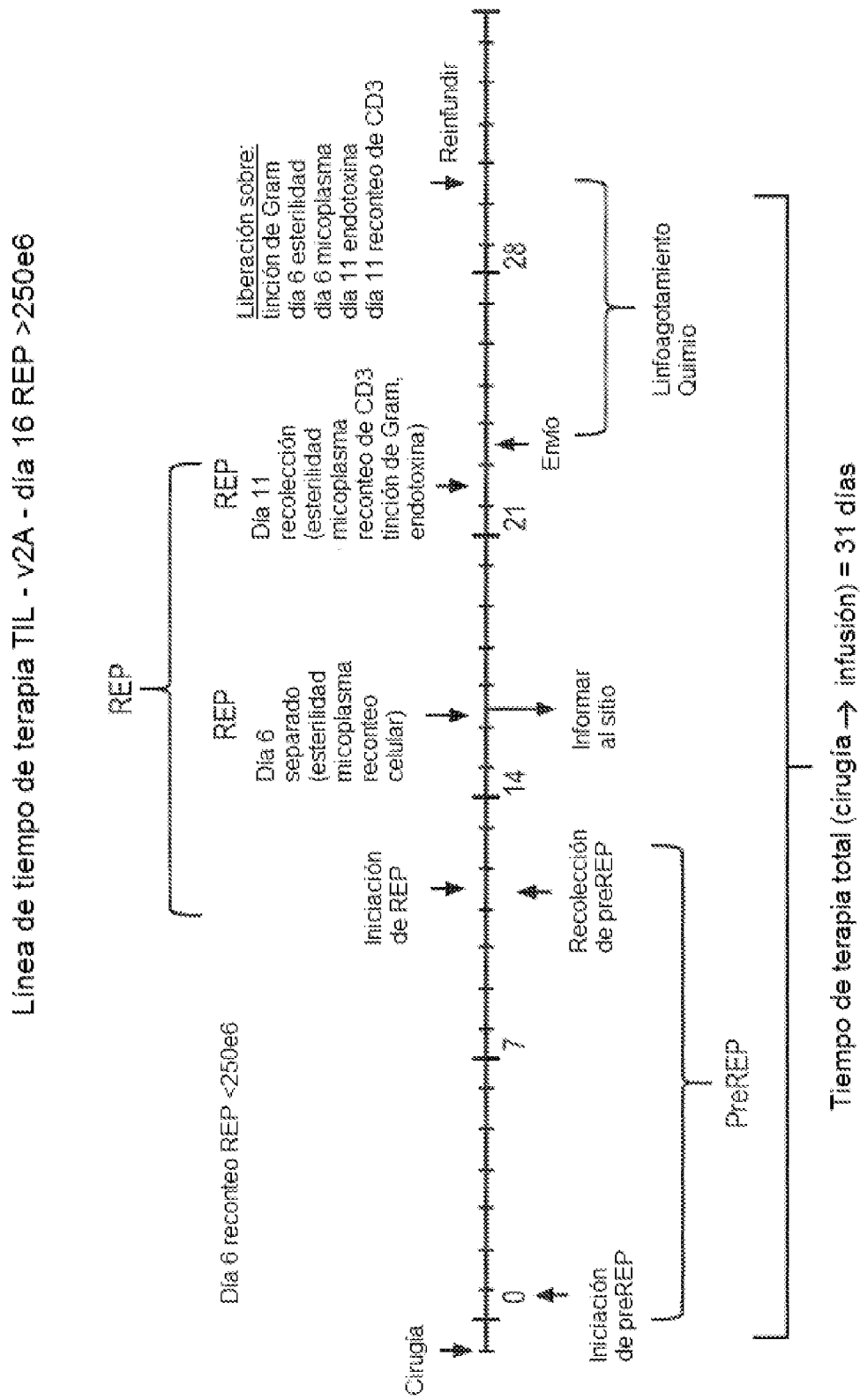


Figura 5

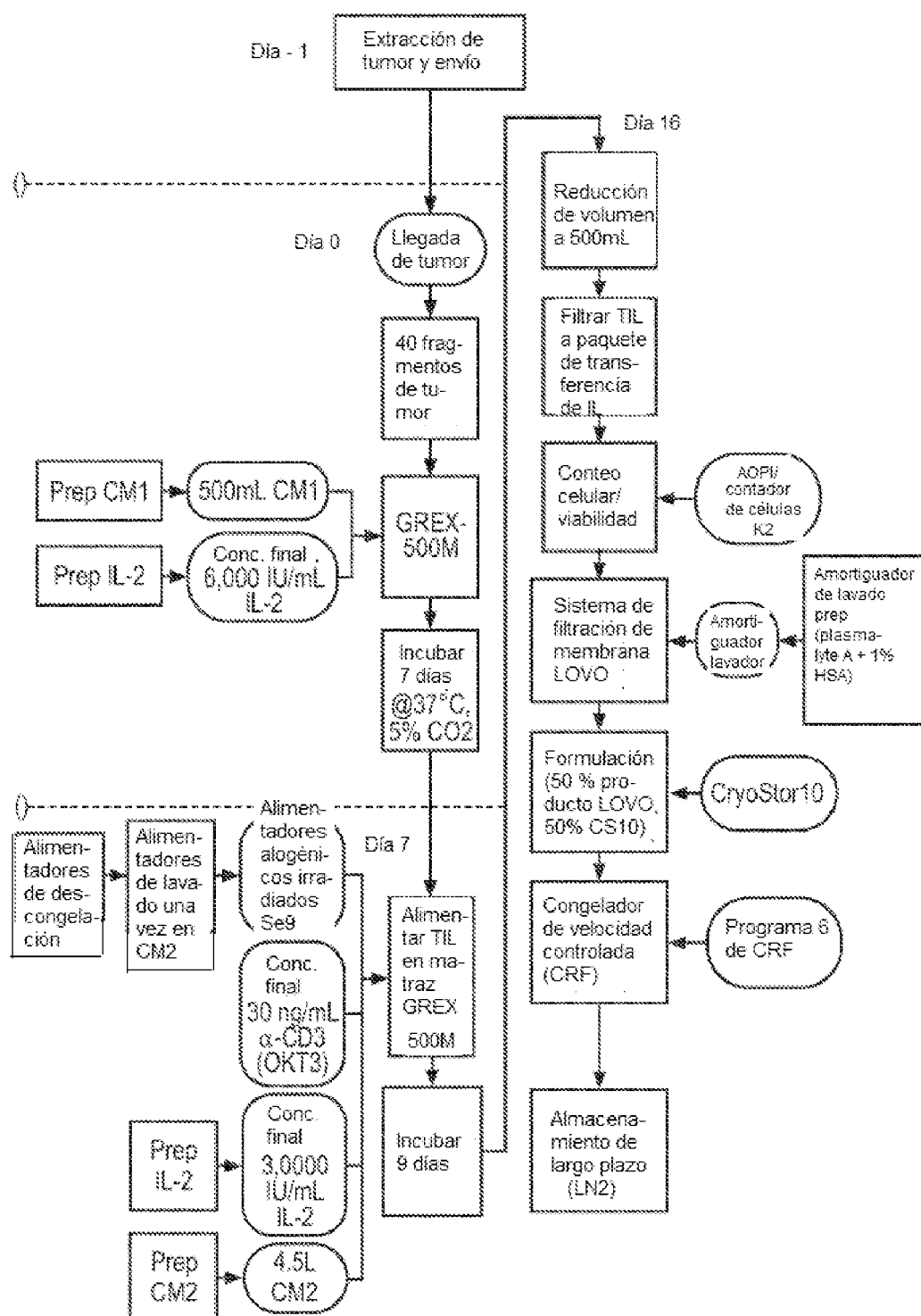
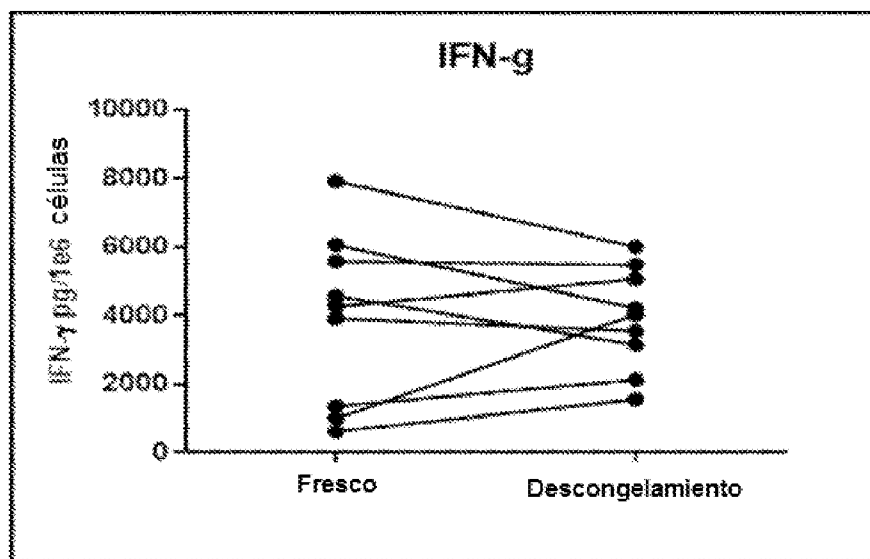


Figura 6

Figura 7

Valor P	0.9797
Resumen de valor P	ns
¿Significativamente diferente? ($P < 0.05$)	No
¿Valor P de una cola o de dos colas?	de dos colas
t, df	t=0.02626 df=8
Número de pares	9



¿Qué tan efectivo fue el emparejamiento?
Coefficiente de correlación (r)
Valor P (de una cola)
Resumen de valor P
¿Fue el emparejamiento significativamente efectivo?

Figura 8

Resumen de valor P

ns

¿Significativamente diferente? ($P < 0.05$)

No

¿Valor P de una o dos colas?

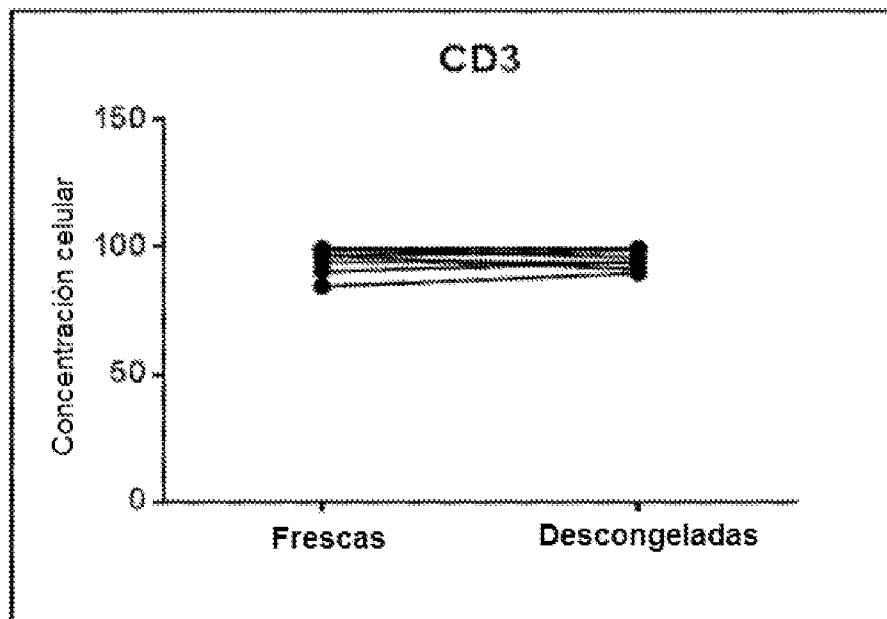
De dos colas

t, df

t=0.8479 df=7

Número de pares

8



¿Qué tan efectivo fue el emparejamiento?

0.9711

Coeficiente de correlación (r)

< 0.0001

Valor P (de una cola)

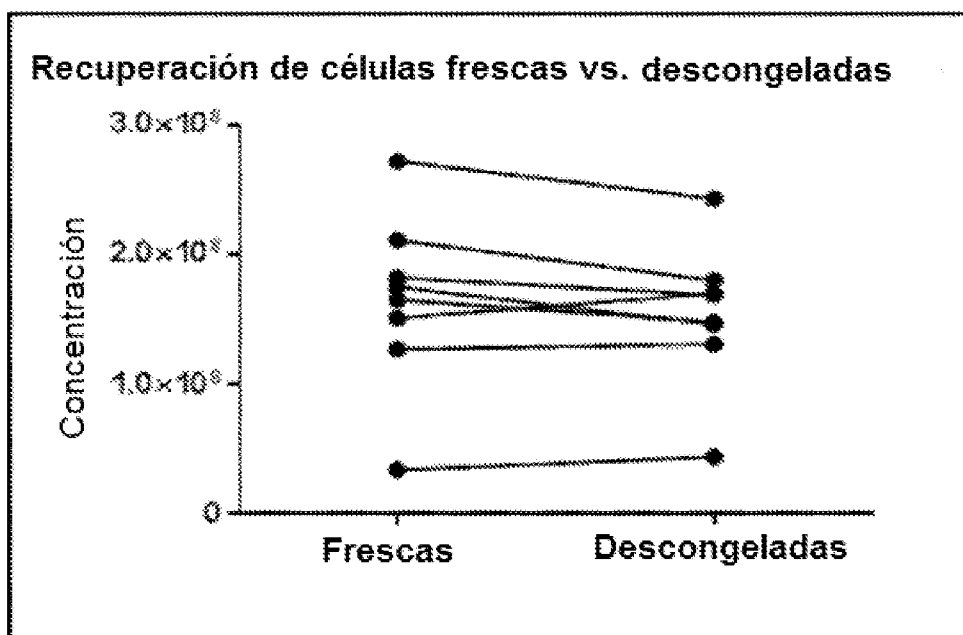
Resumen de valor P

Si

¿El emparejamiento fue significativamente efectivo?

Figura 9

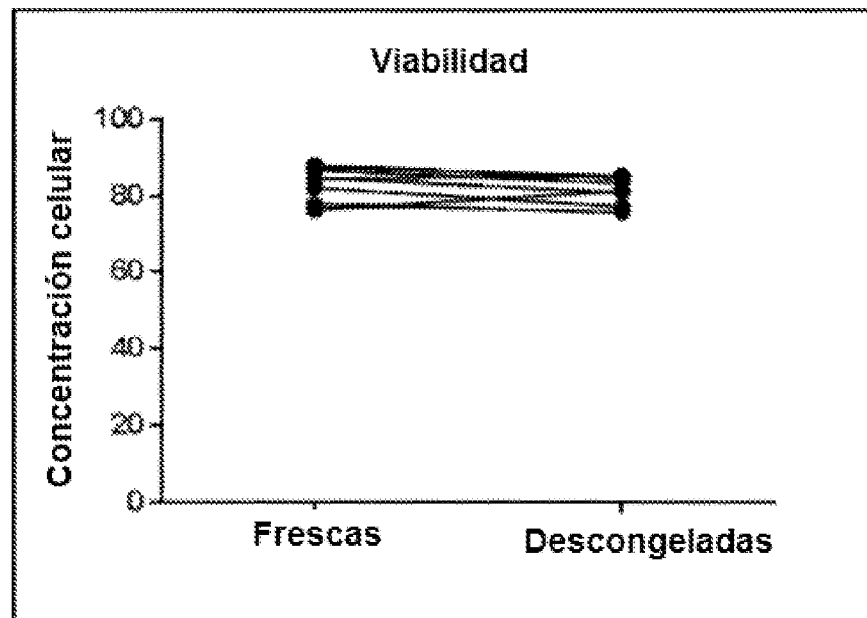
Resumen de valor P	ns
¿Significativamente diferente? ($P < 0.05$)	No
¿Valor P de una o de dos colas?	De dos colas
t, df	t=1.568 df=7
Número de pares	8



¿Qué tan efectivo fue el emparejamiento?	
Coefficiente de correlación (r)	0.7448
Valor P (de una cola)	0.017
Resumen de valor P	*
¿El emparejamiento fue significativamente efectivo?	SI

Figura 10

Resumen de valor P	ns
¿Significativamente diferente? ($P < 0.05$)	No
¿Valor P de una o de dos colas?	De dos colas
t, df	t=1.596 df=7
Número de pares	8



¿Qué tan efectivo fue el emparejamiento?	
Coefficiente de correlación (r)	0.6932
Valor P (de una cola)	0.0283
Resumen de valor P	*
¿El emparejamiento fue significativamente efectivo?	Si

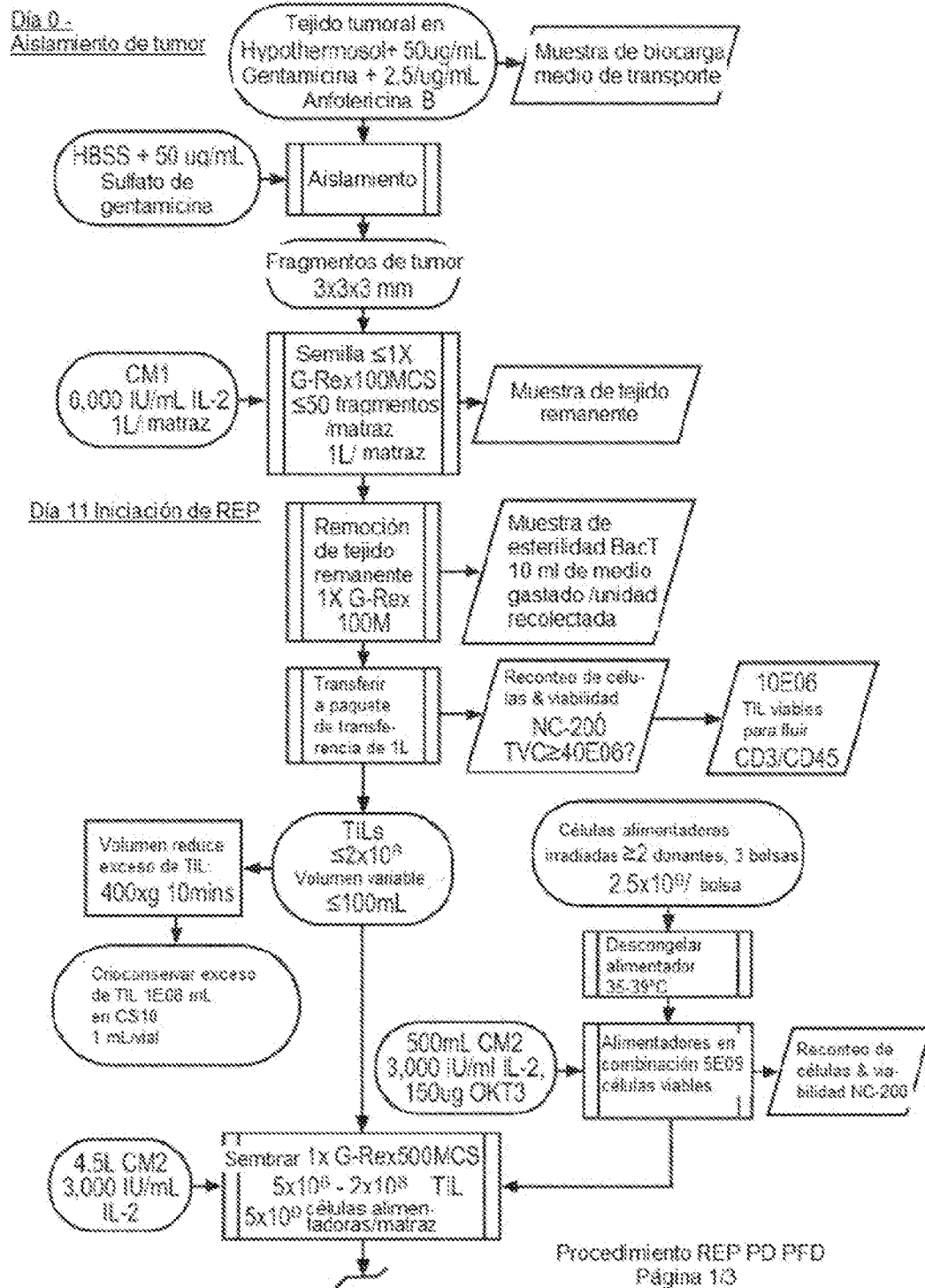
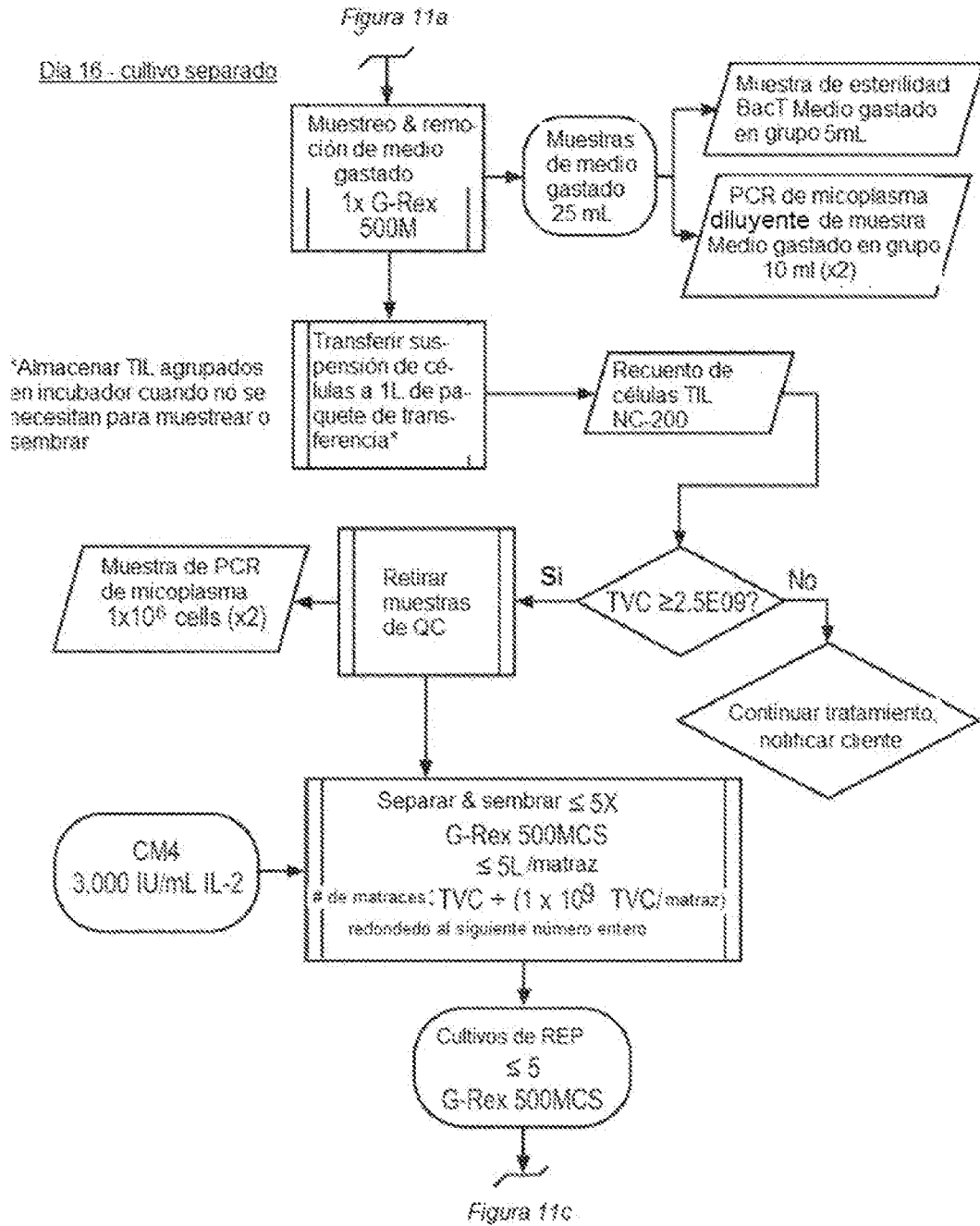


Figura 11b

Figura 11a



Procedimiento REP PD PFD
Página 2/3

Figura 11b

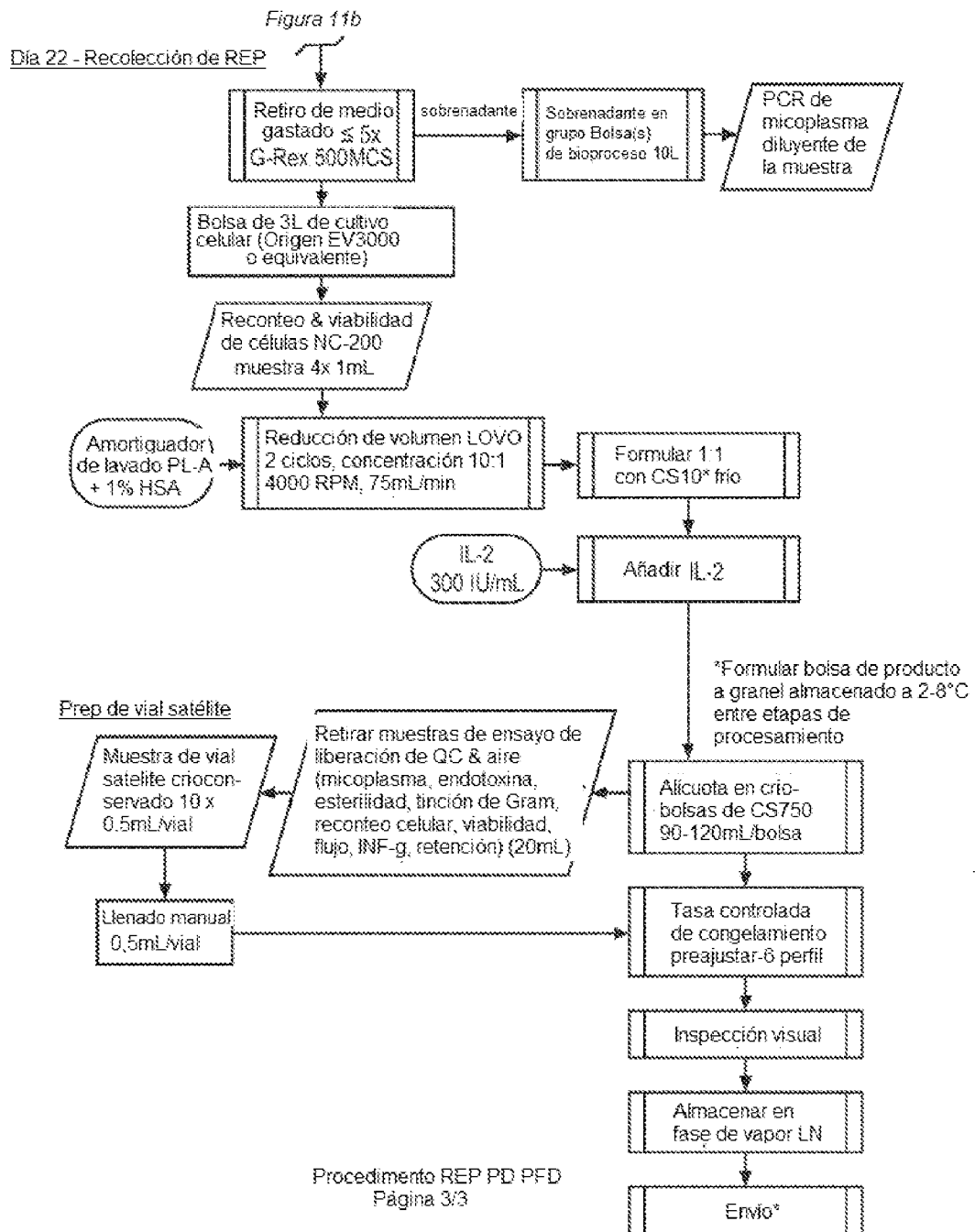


Figura 11c

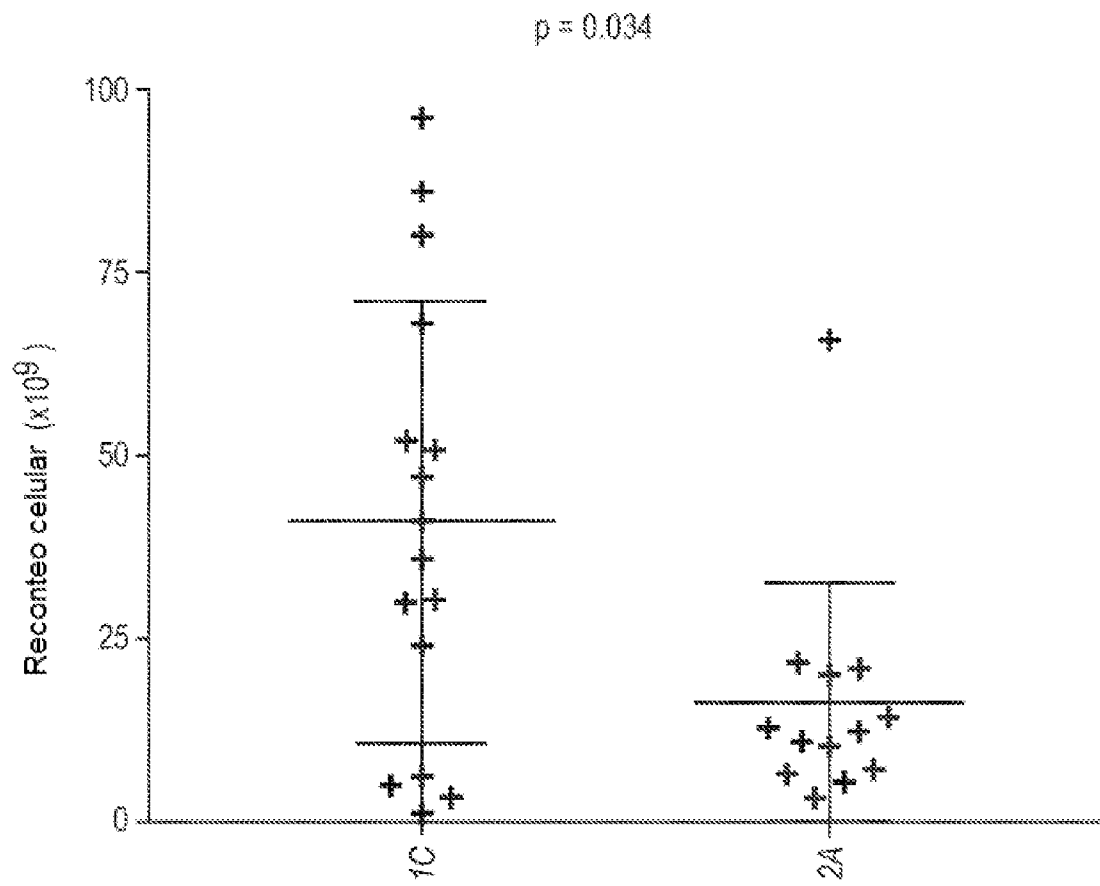


Figura 12

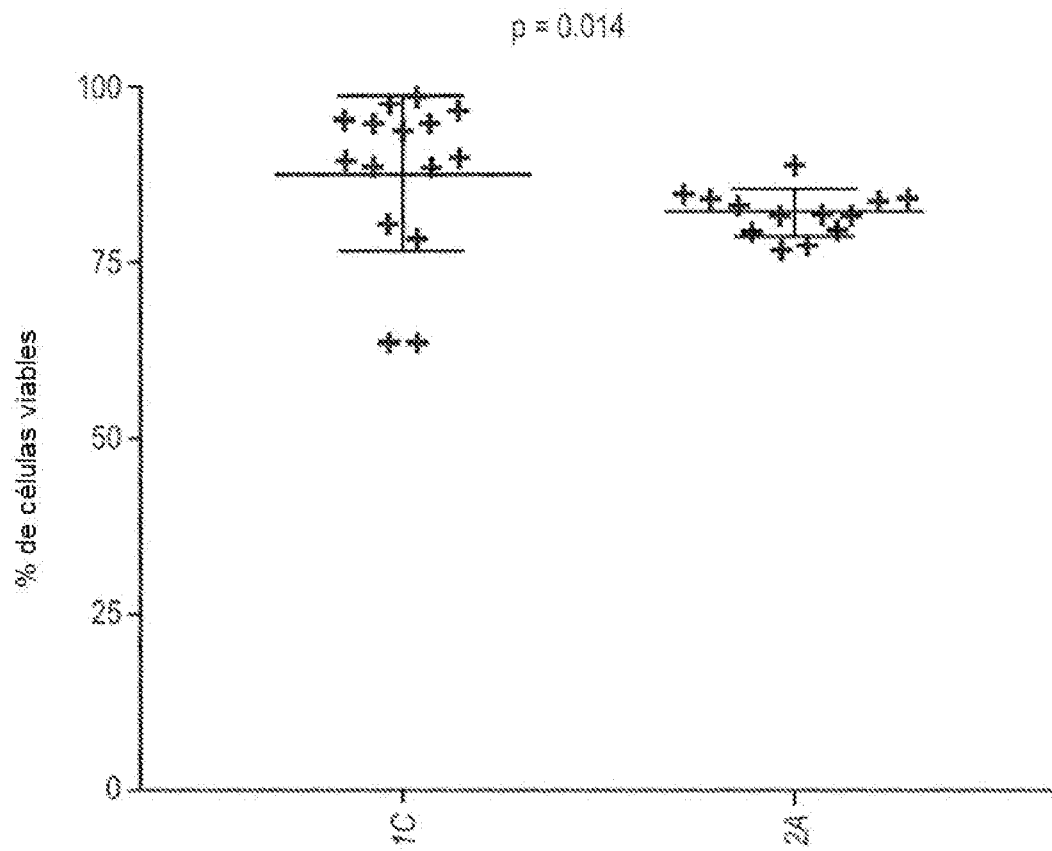


Figura 13

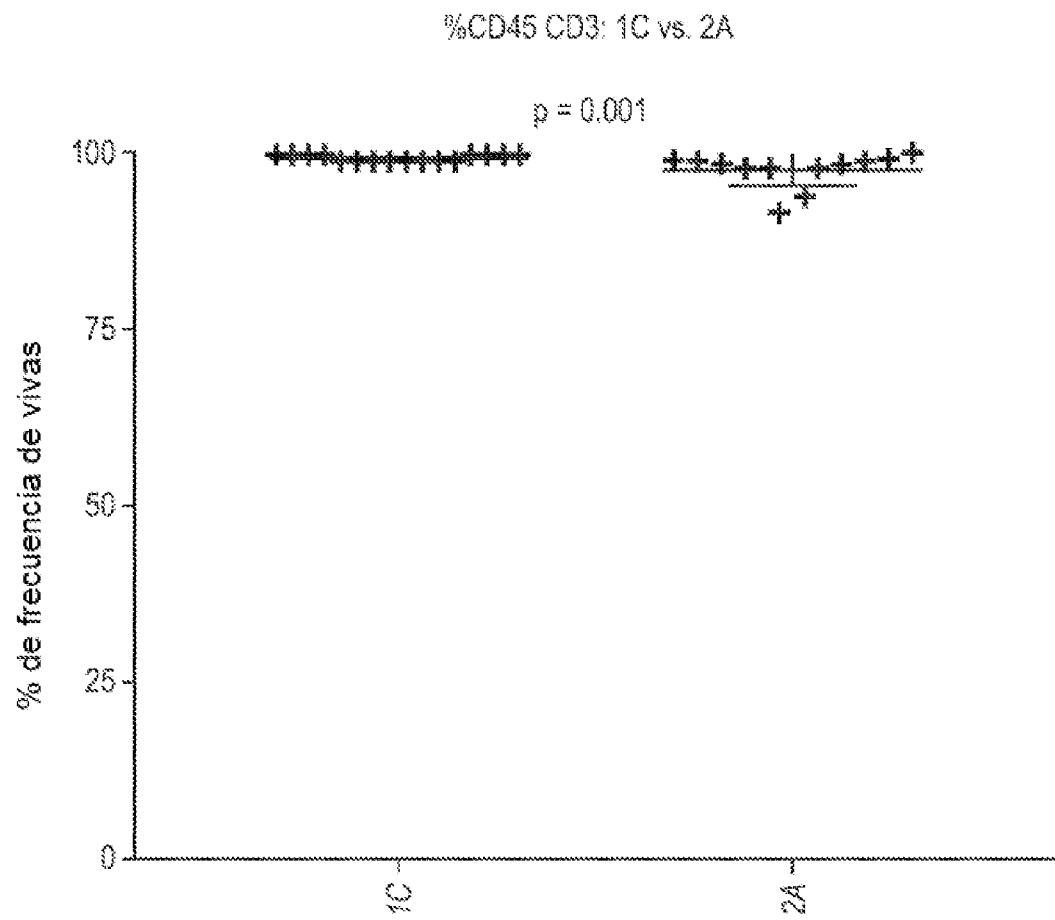


Figura 14

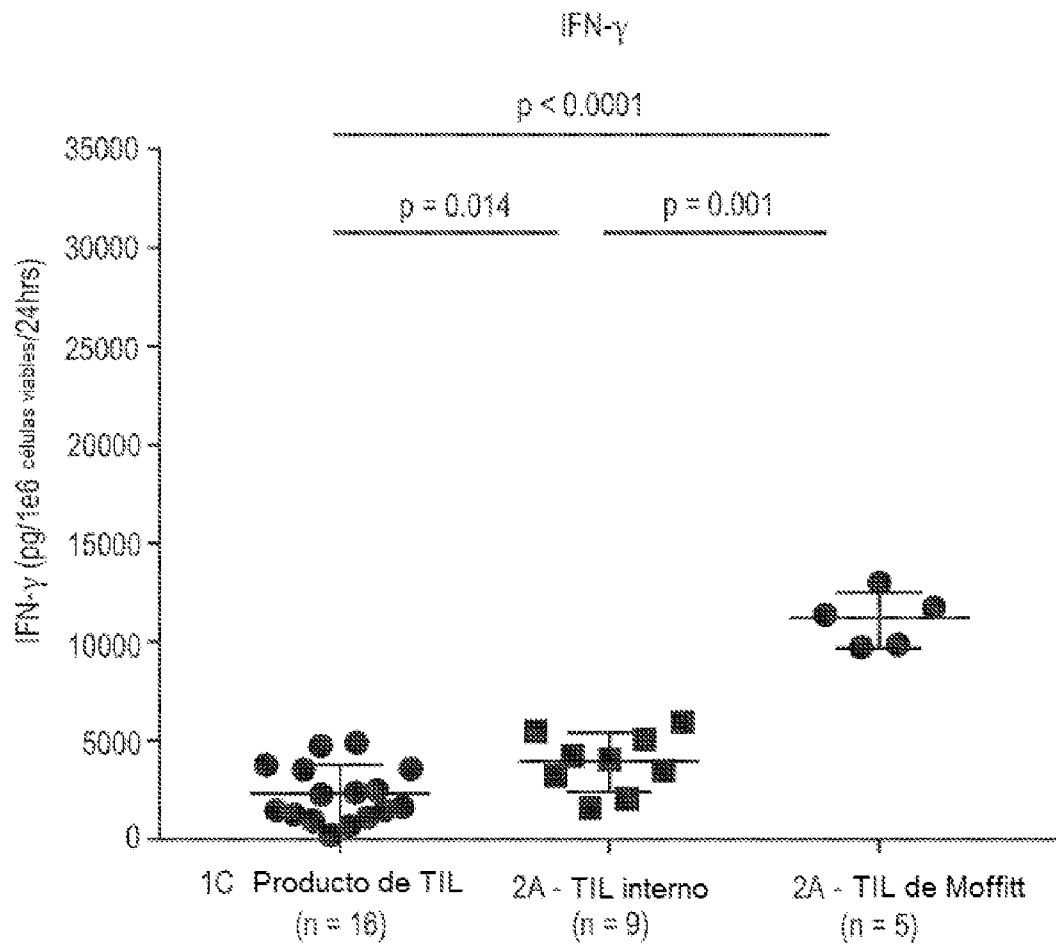


Figura 15

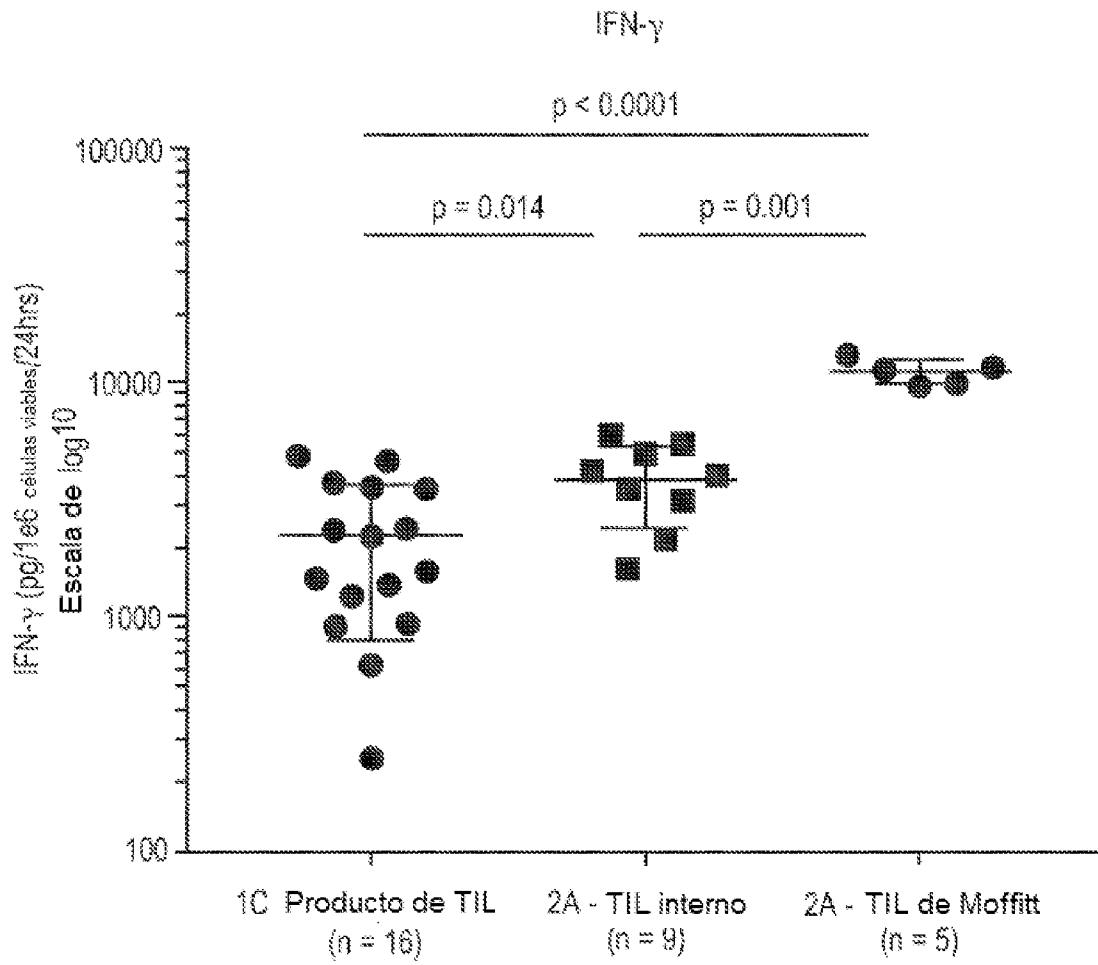


Figura 16

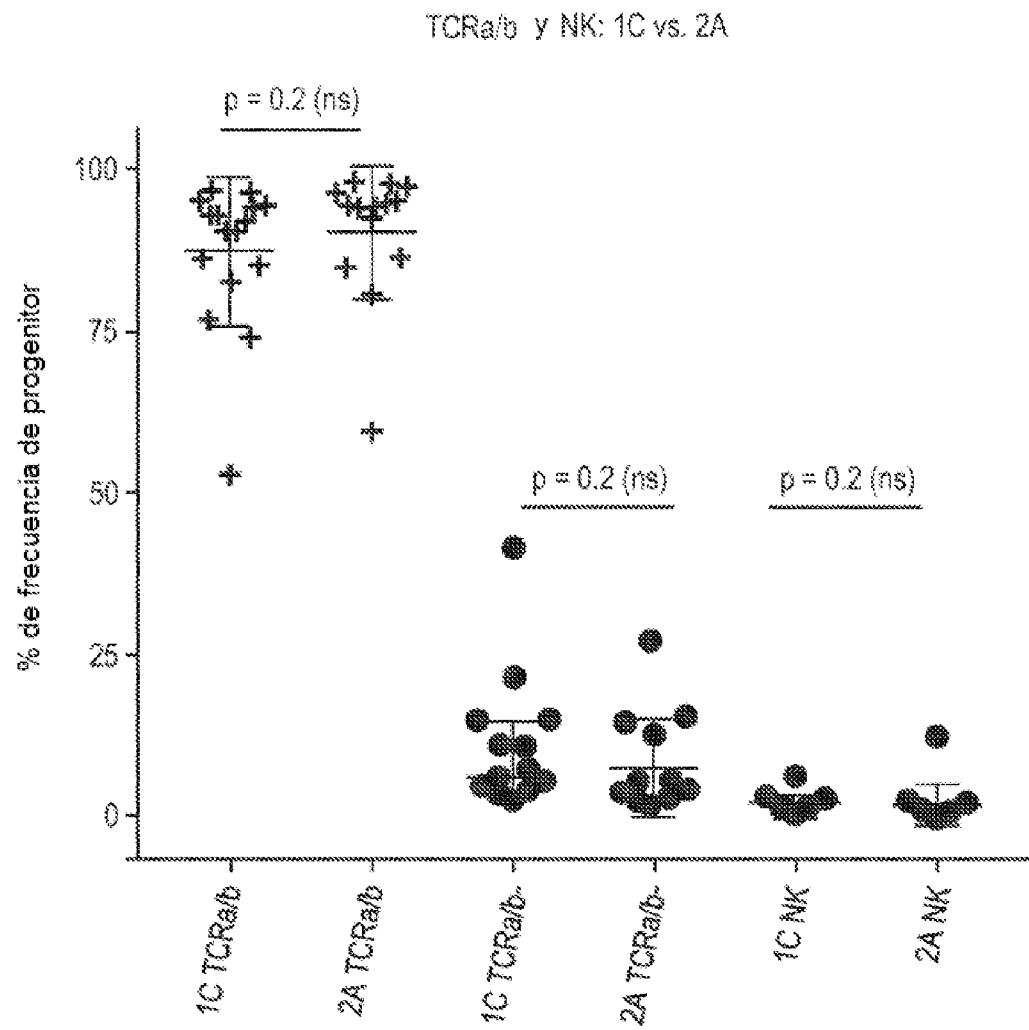


Figura 17

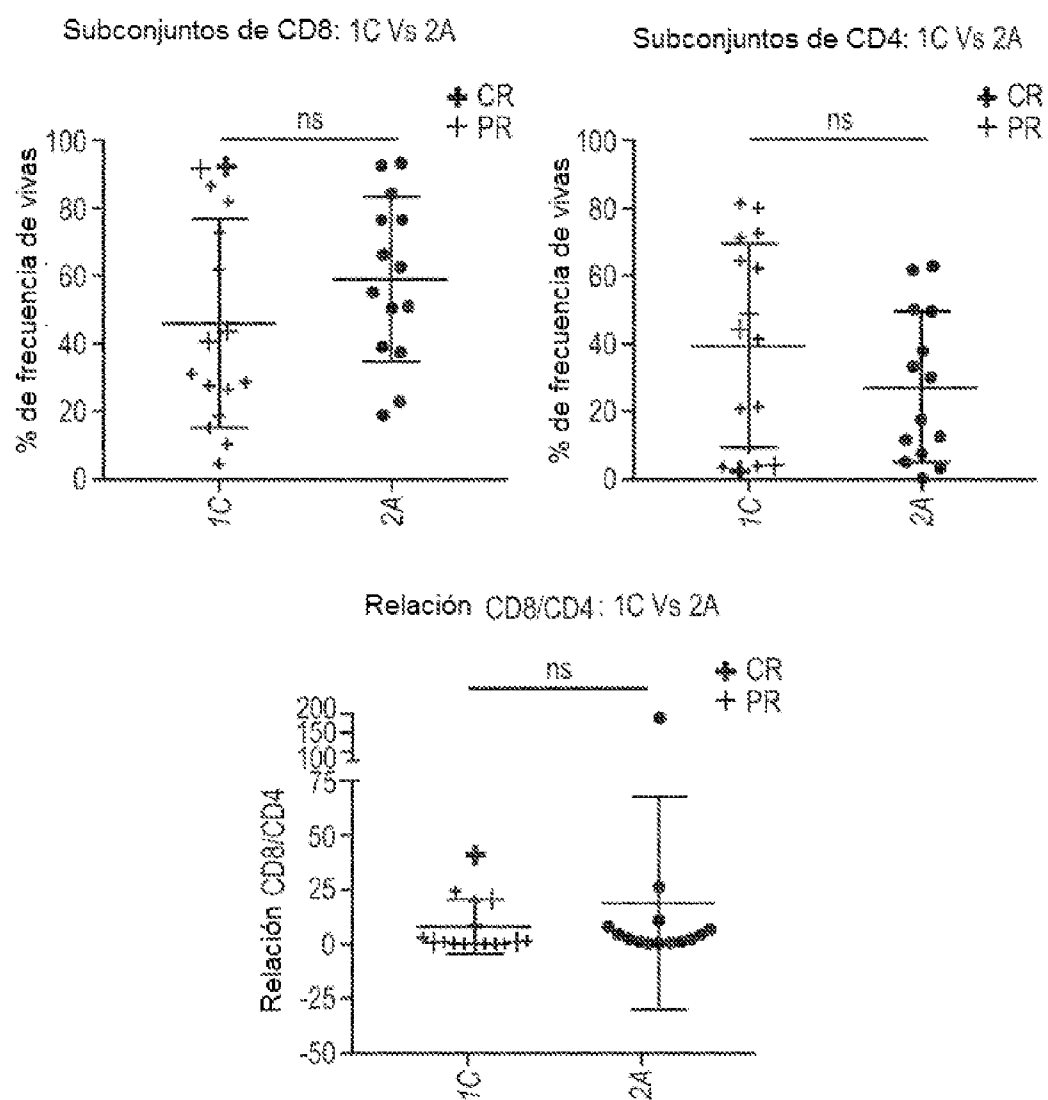


Figura 18

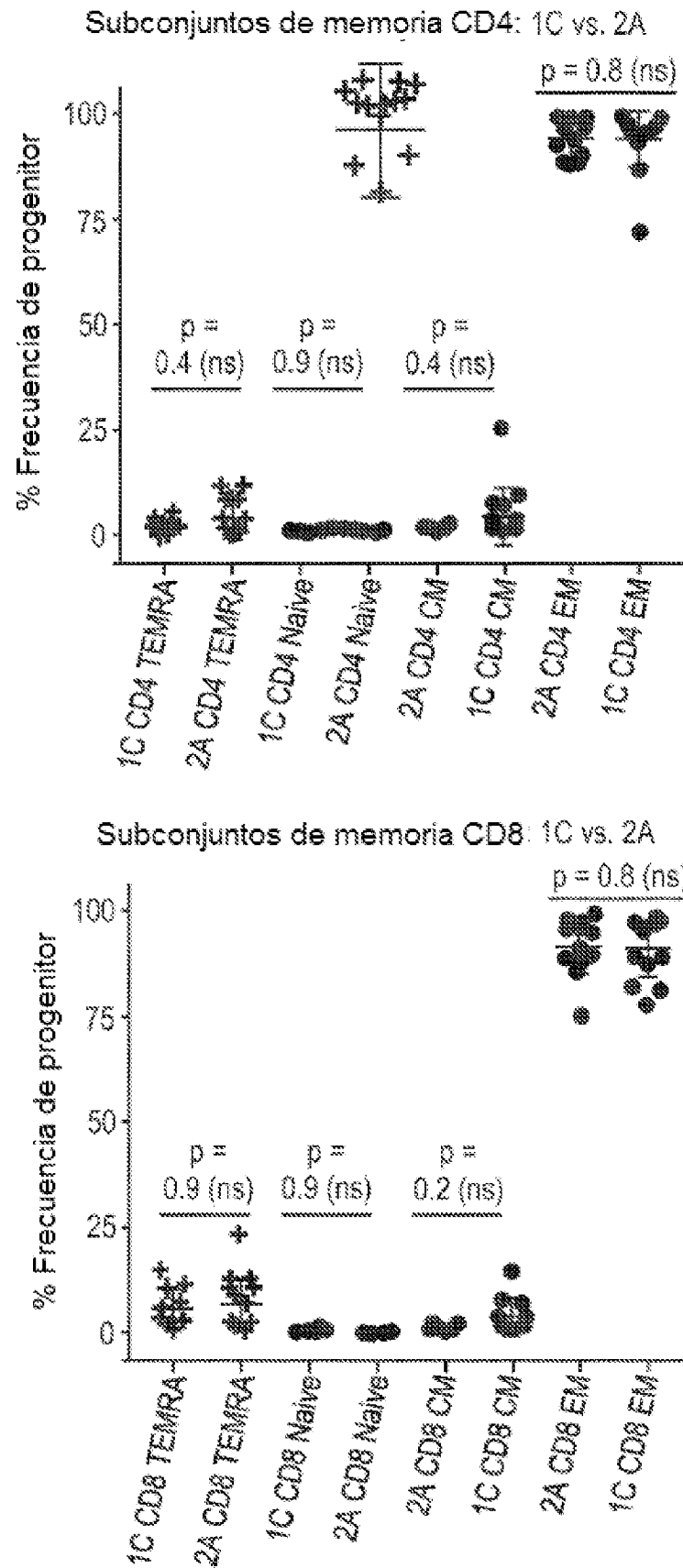


Figura 19

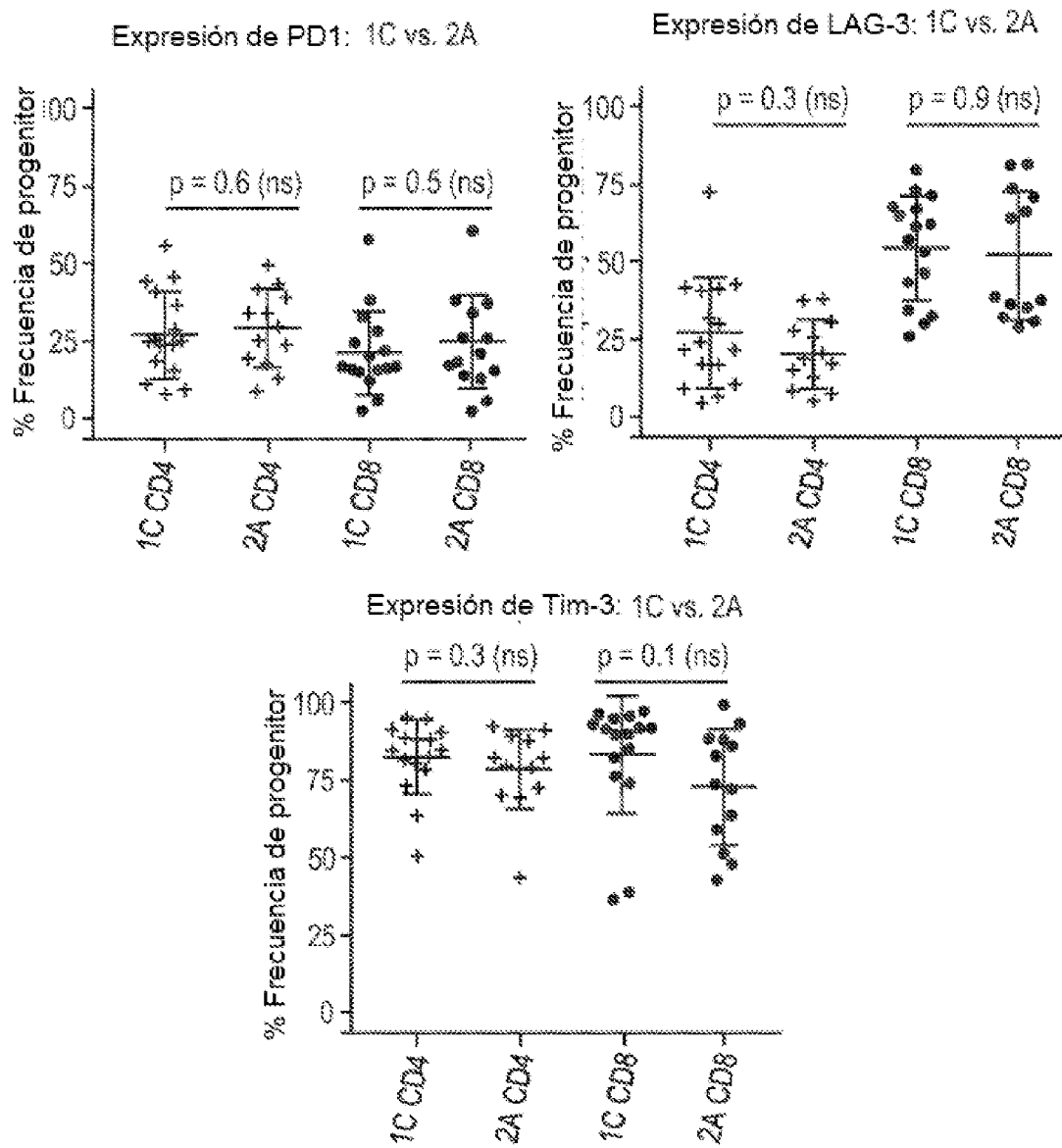


Figura 20

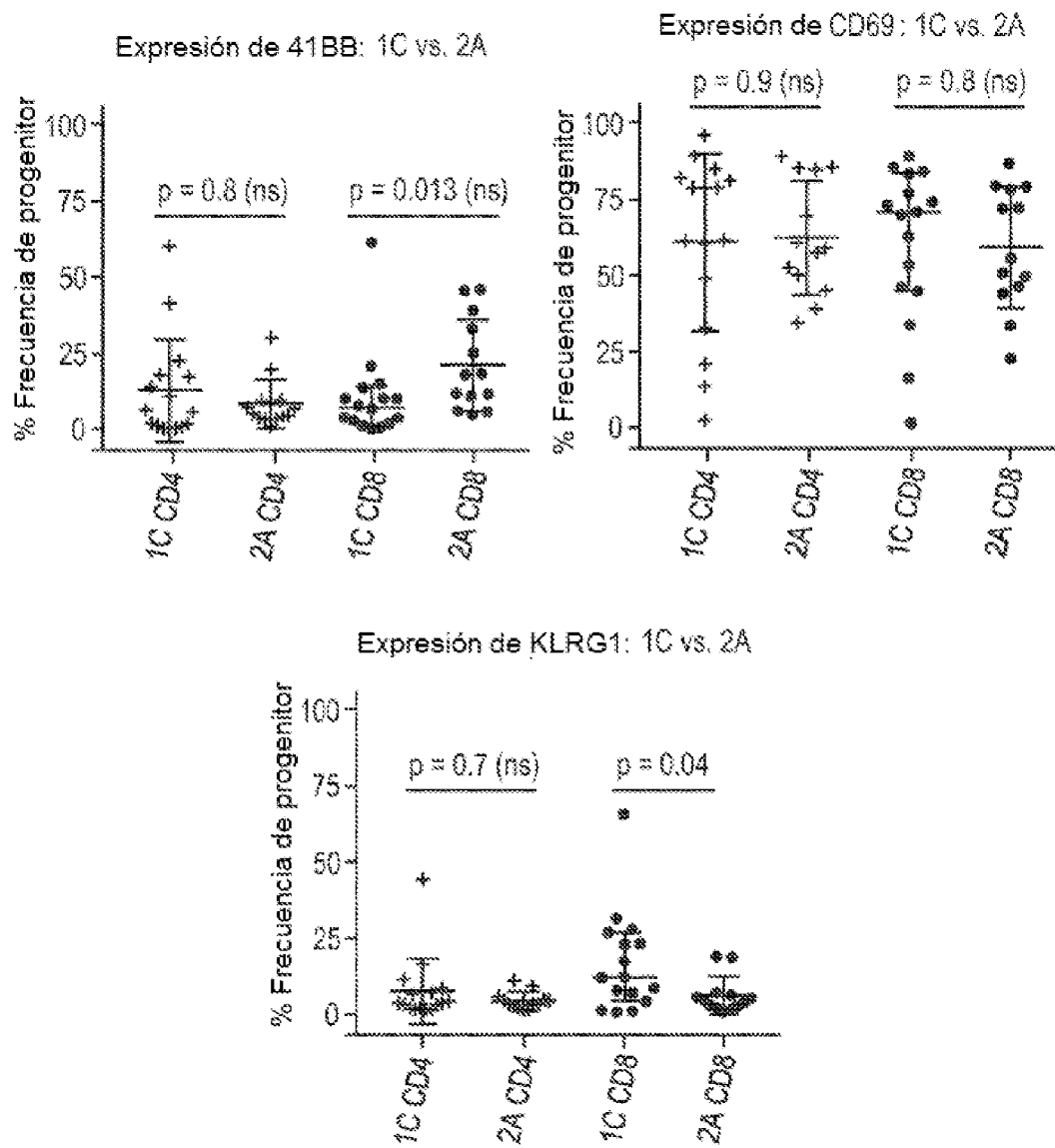


Figura 21

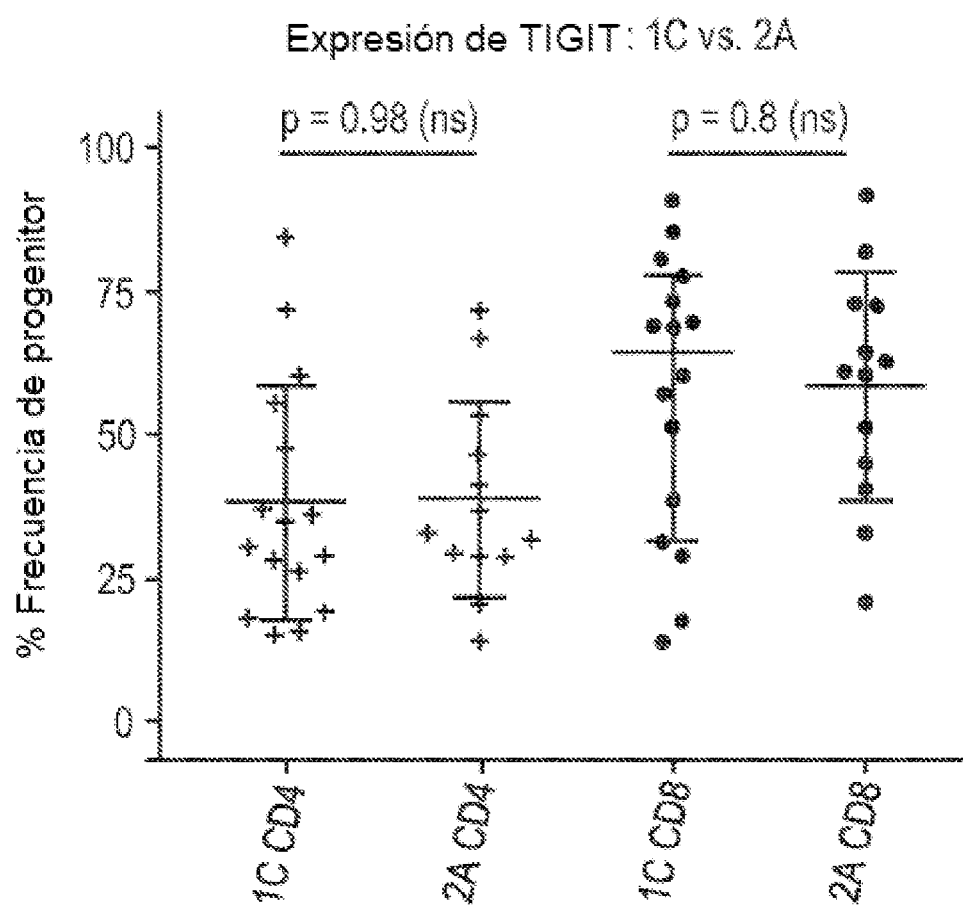


Figura 22

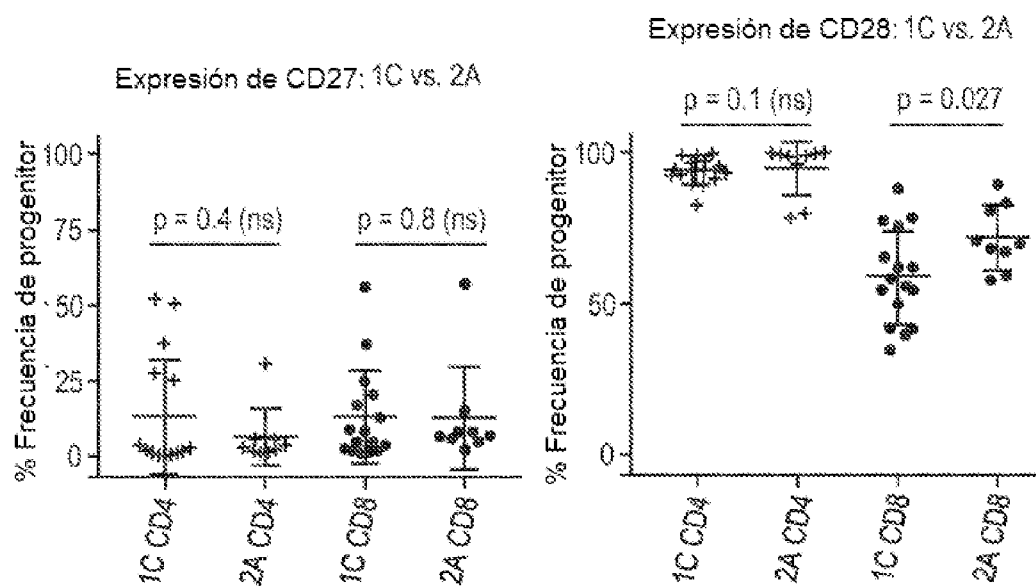


Figura 23

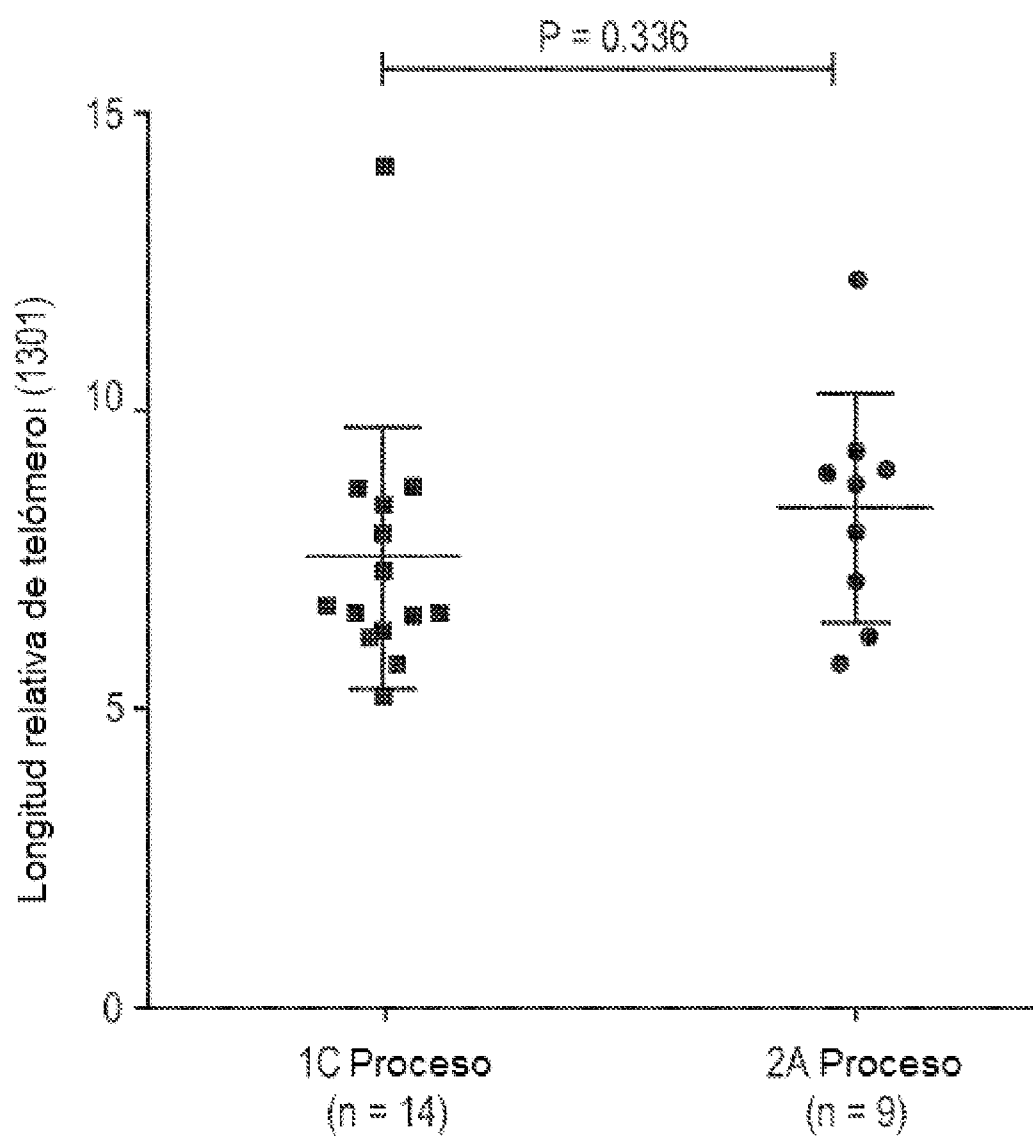


Figura 24

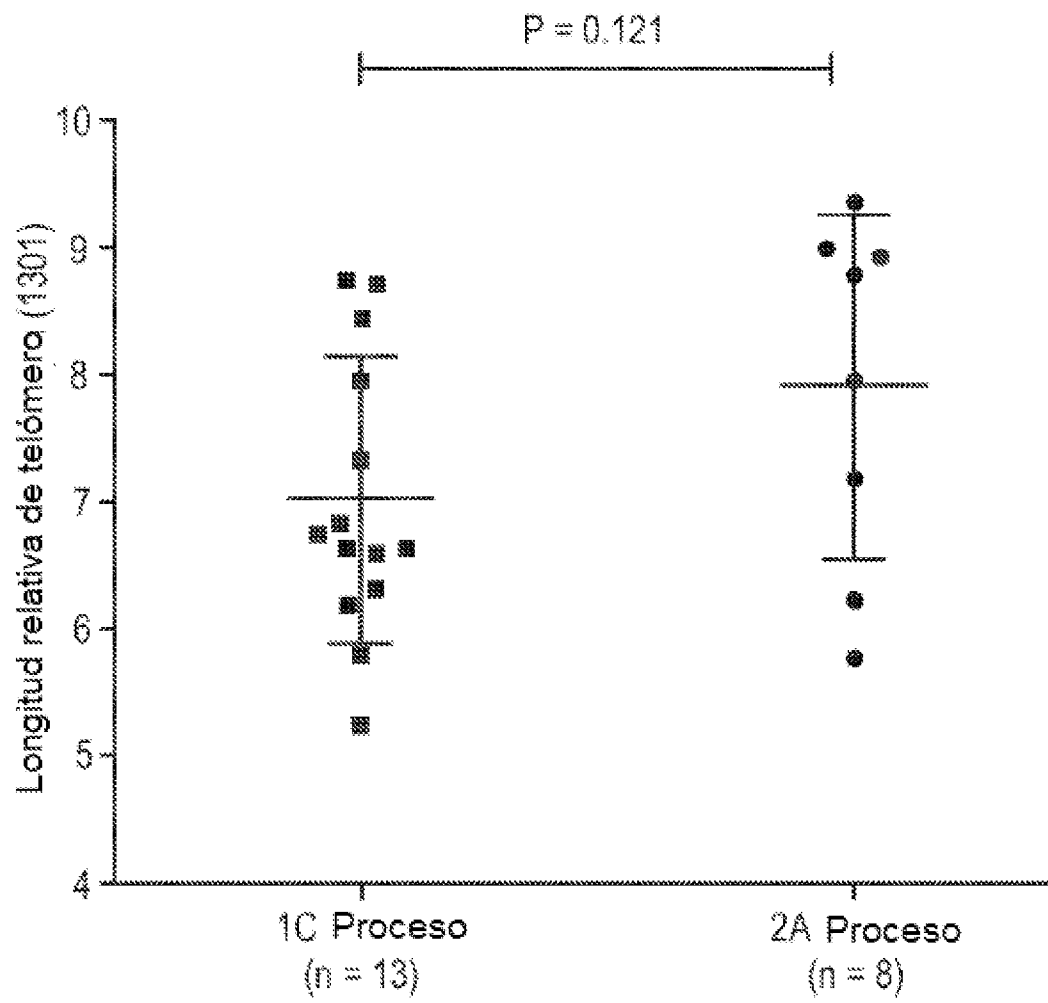


Figura 25

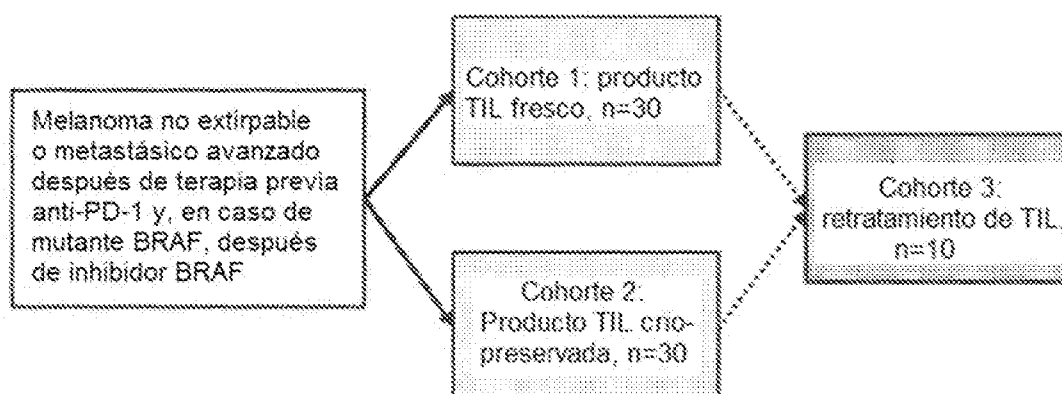
Figura 26

Figura 27

Proceso 2A: cerca de 22 días de las etapas A -E

1. ETAPA A

Obtener muestra tumoral de paciente

2. ETAPA B

Fragmentación y primera expansión

3 días a 14 días

3. ETAPA C

Transición de primera expansión a segunda expansión

Sin almacenamiento y sistema cerrado

4. ETAPA D

Segunda expansión

IL-2, OKT-3, y células alimentadoras presentadoras de antígeno

Sistema cerrado

5. ETAPA E

TIL recogidas de la etapa D

Sistema cerrado

6. ETAPA F

Formulación final y/o transferencia a bolsa de infusión

(opcionalmente crioconservada)

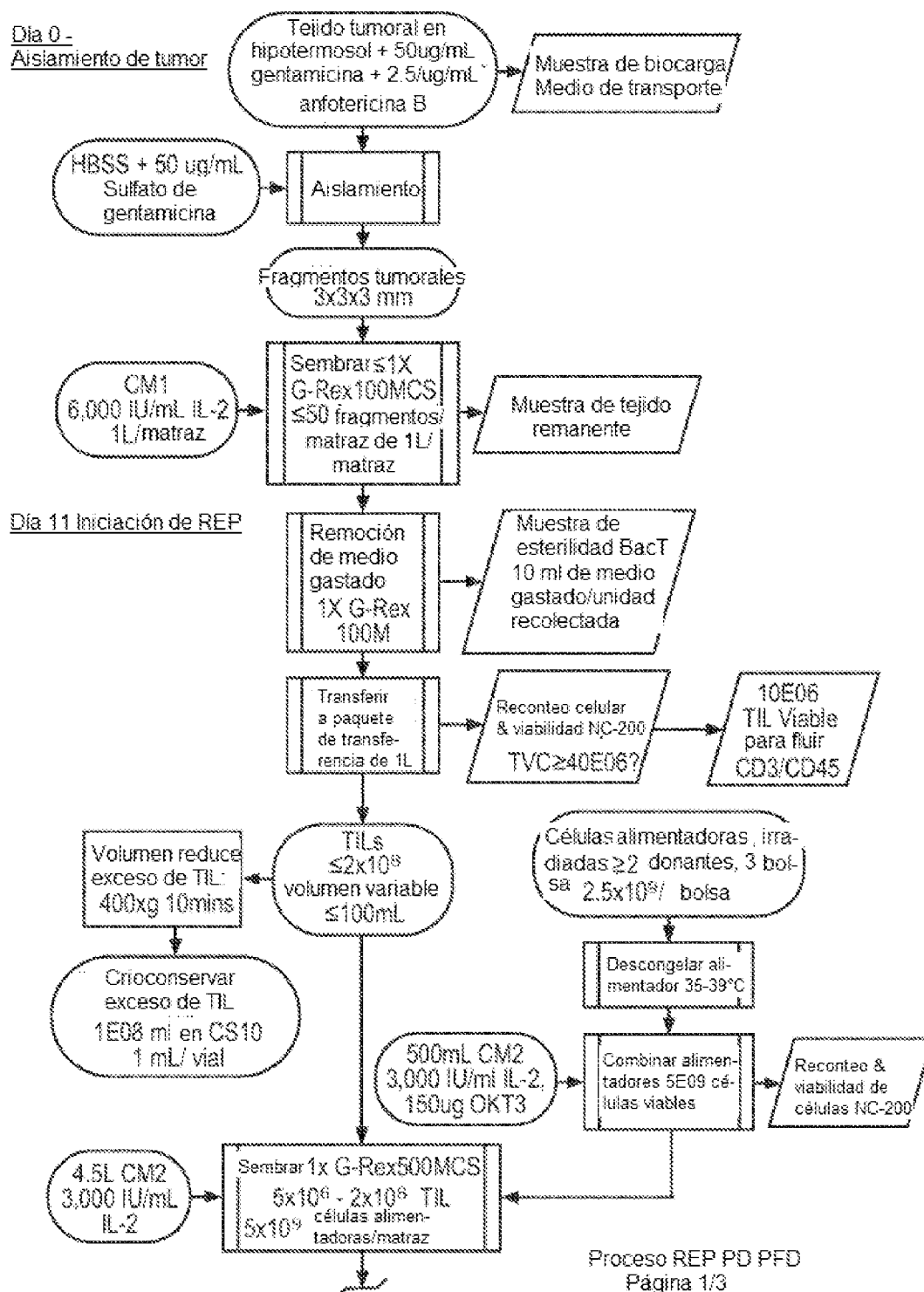
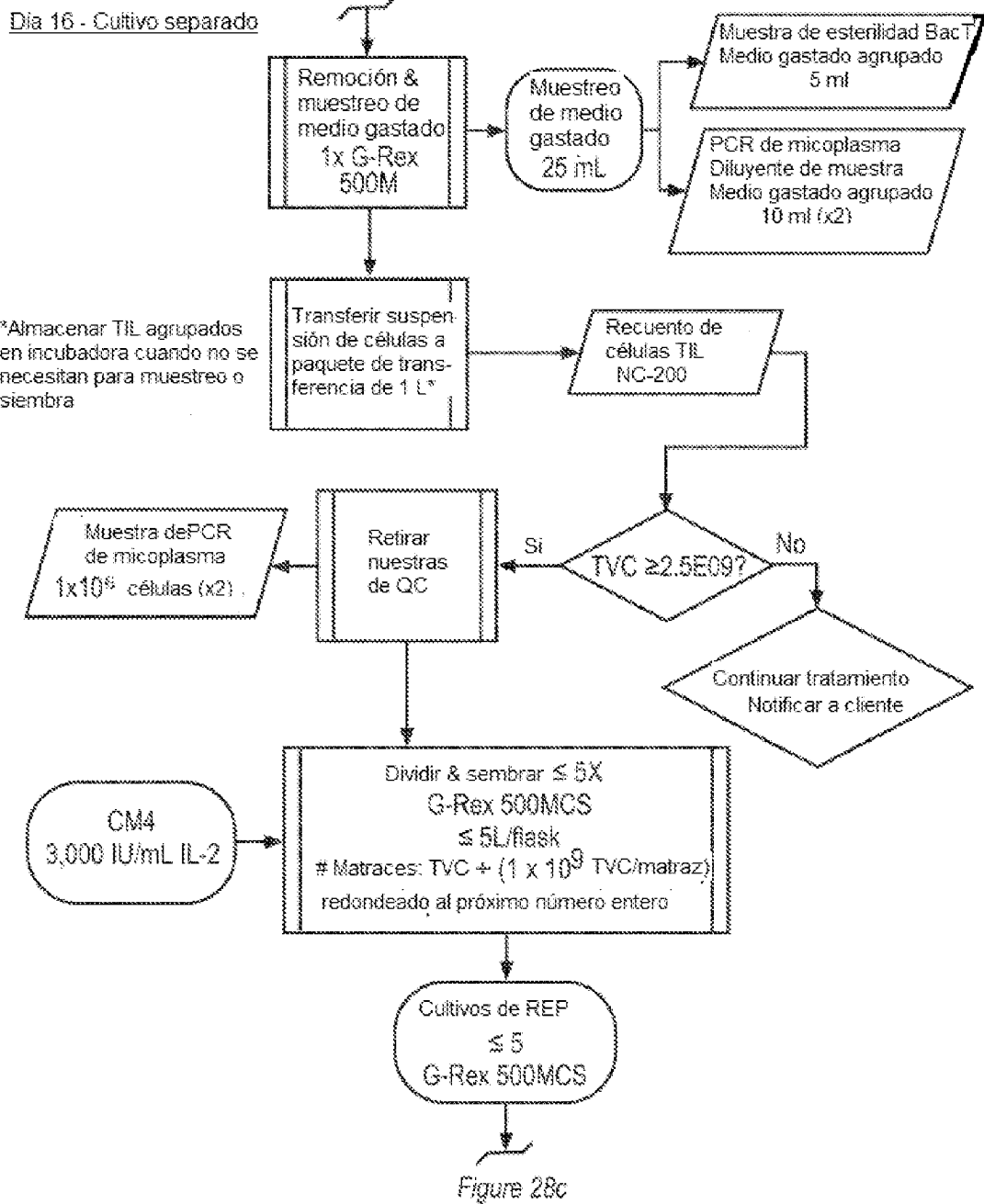


Figura 28b

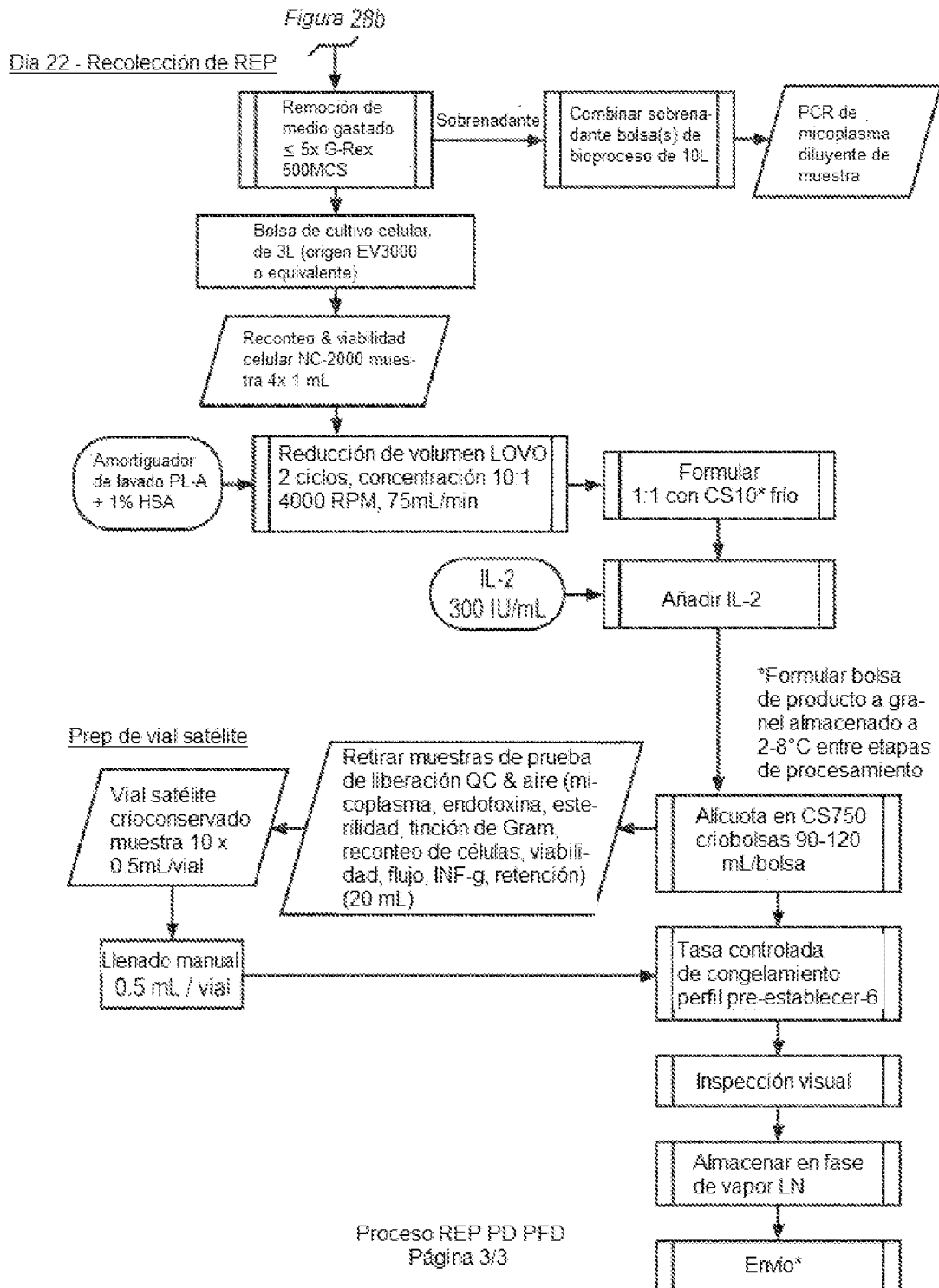
Figura 28a

Figura 28a



Proceso REP PD PFD
Página 2/3

Figura 28b



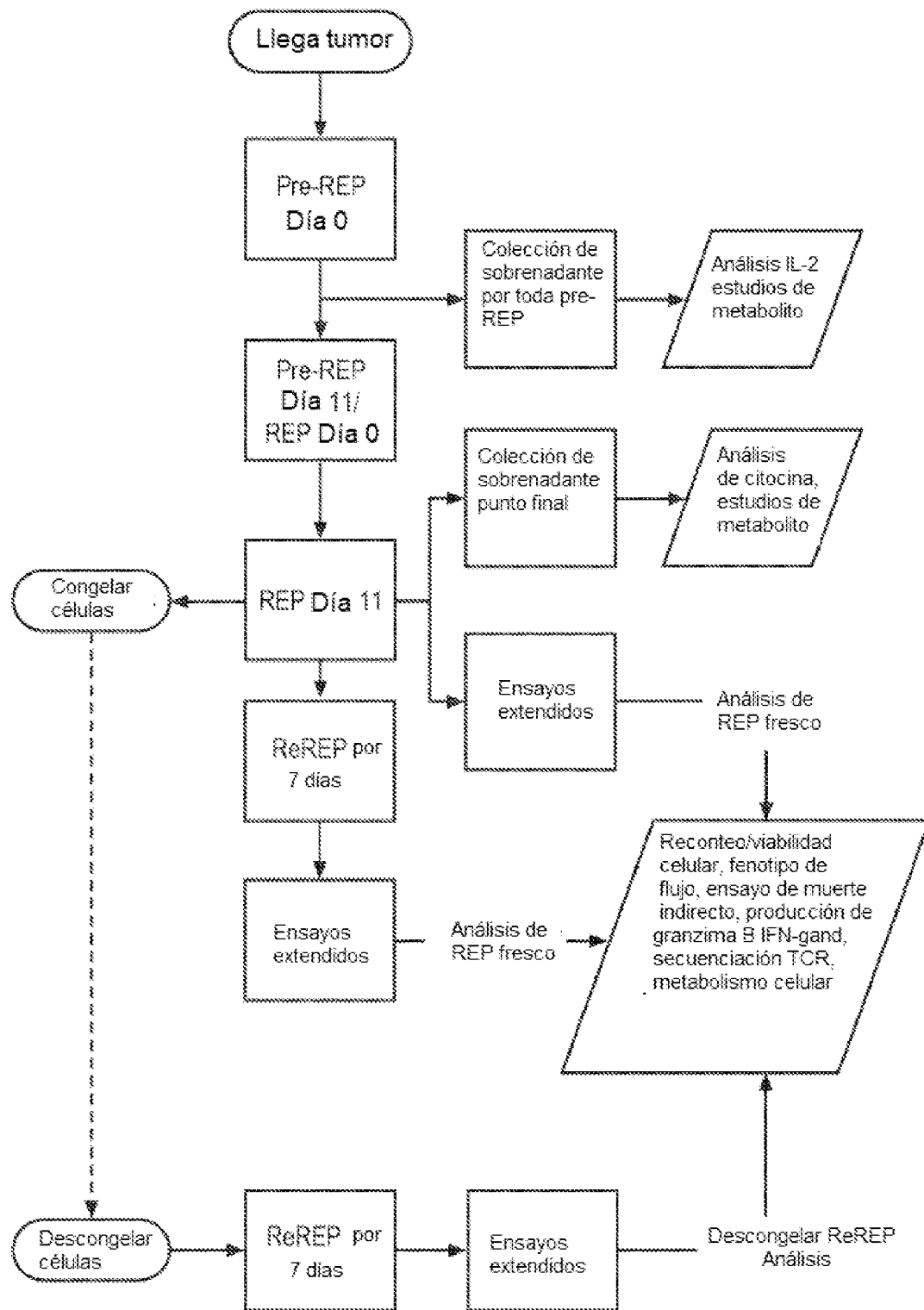


Figure 29

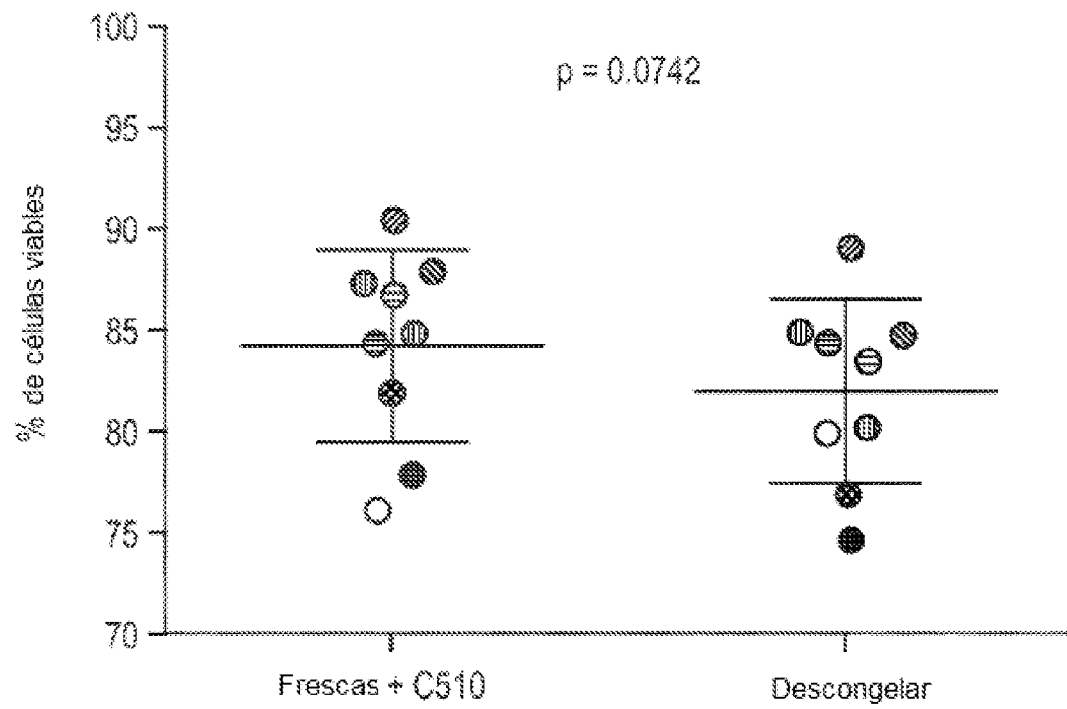


Figure 30

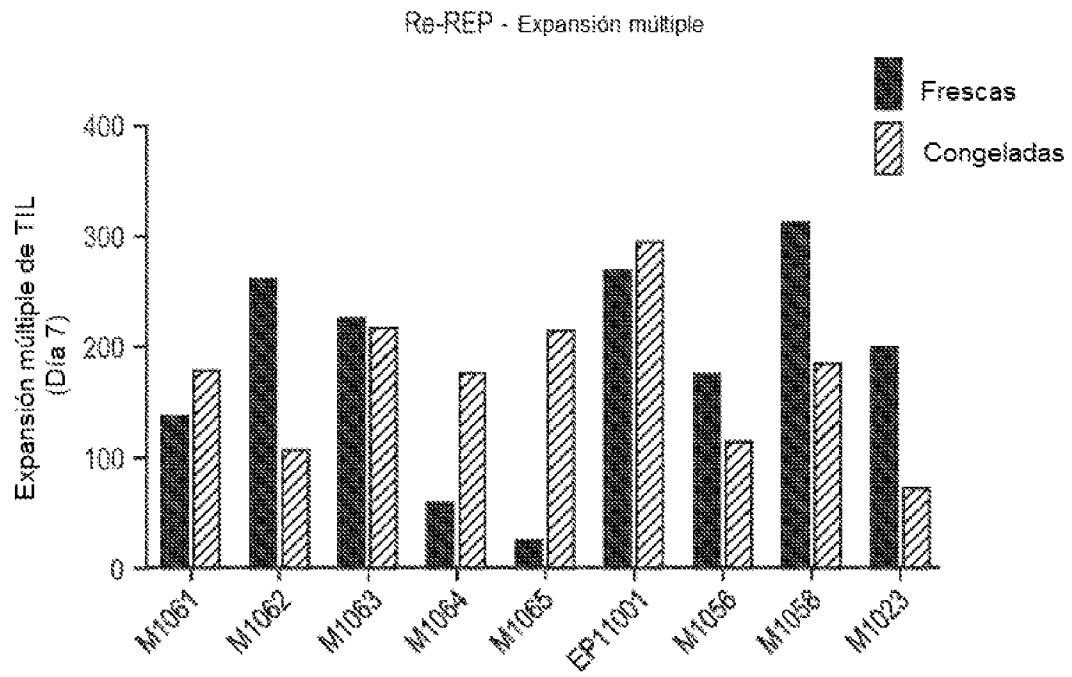


Figura 31

Valores de sangre normal	
Glucosa	0.7-1g/l
Glutamina	0.3-0.65mmol/l
Sodio	135-145mol/l
Potasio	3.5-5.0mmol/l
Ácido láctico	0.060-.16g/l
Amoniaco	.023-.047mmol/l

Figura 32

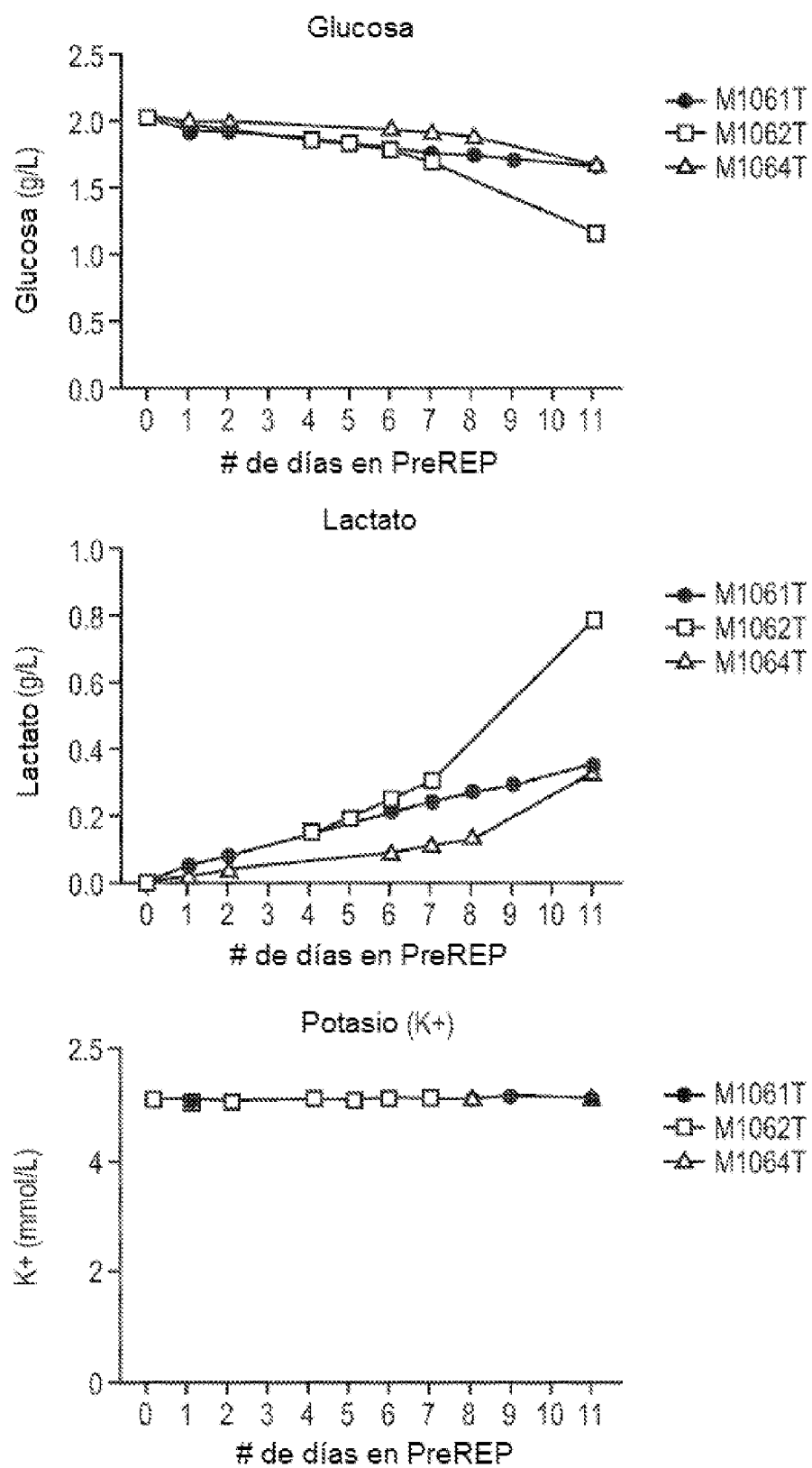


Figura 33a

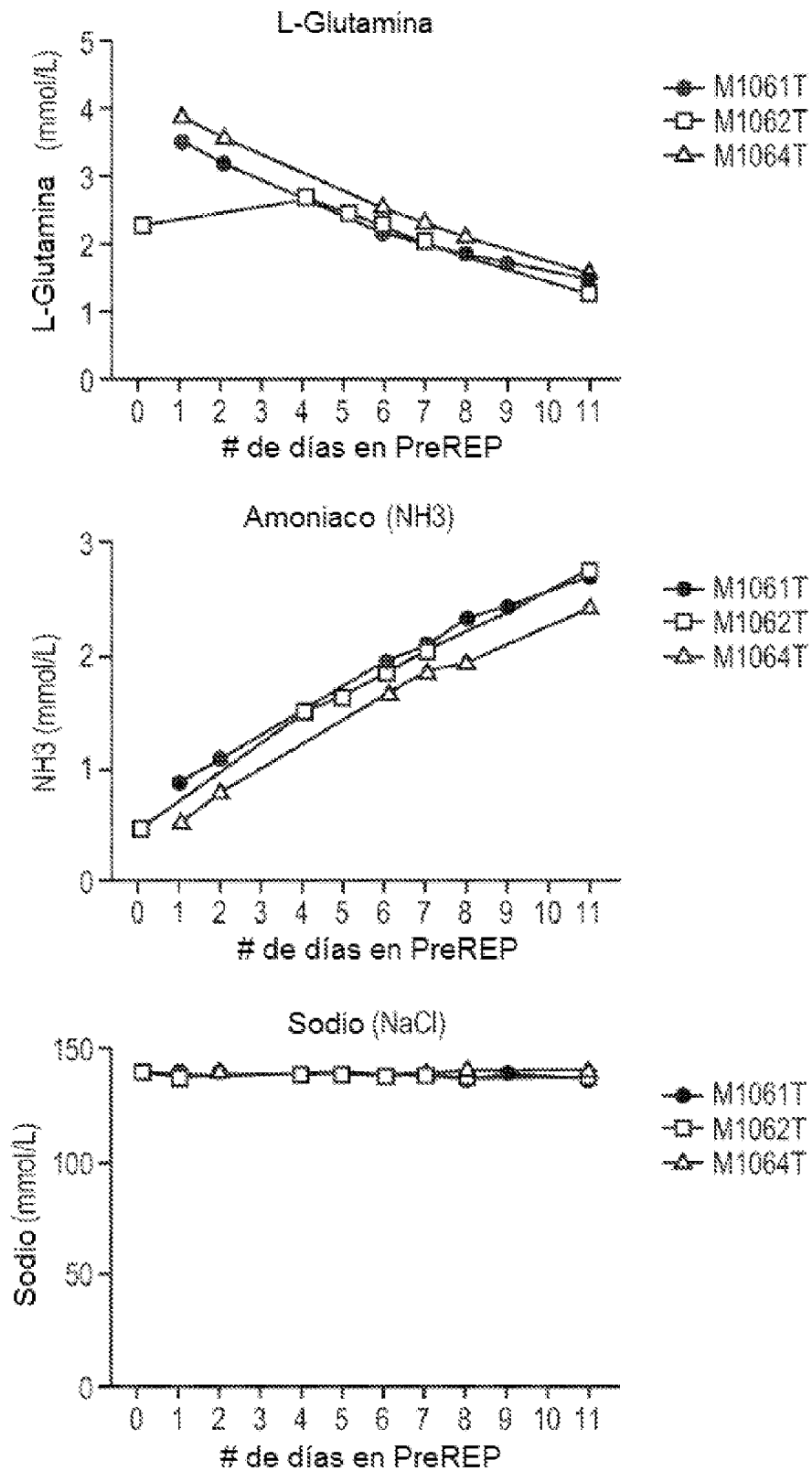


Figura 33b

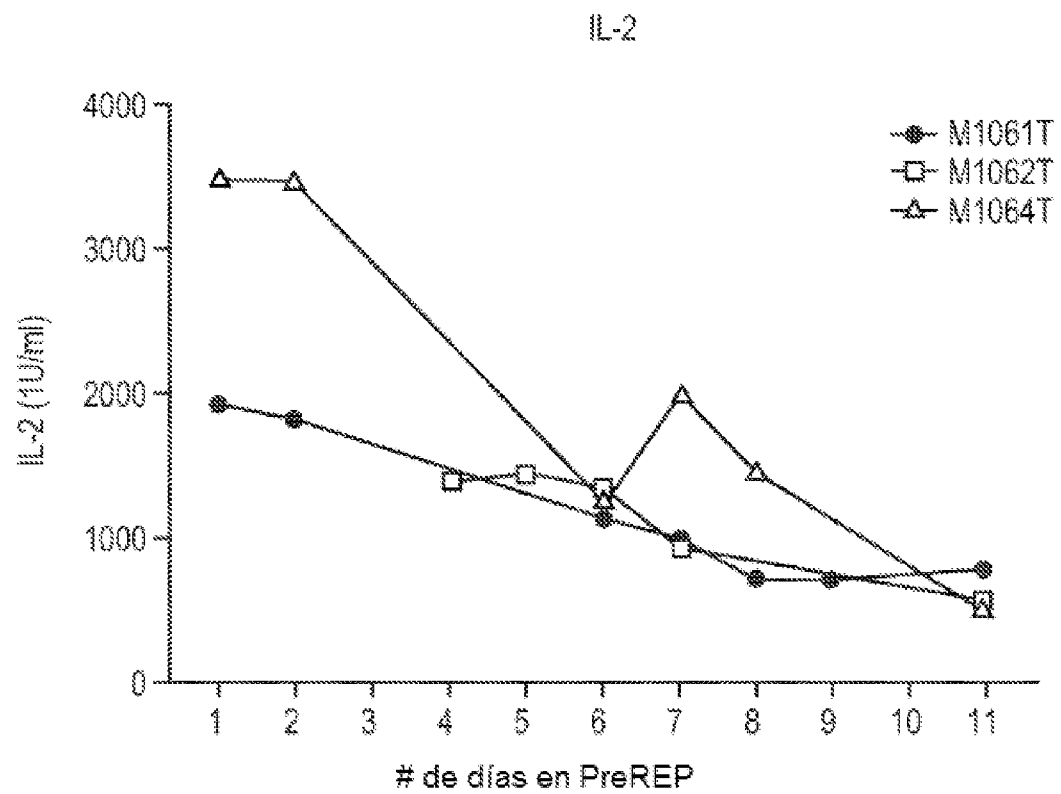


Figura 34

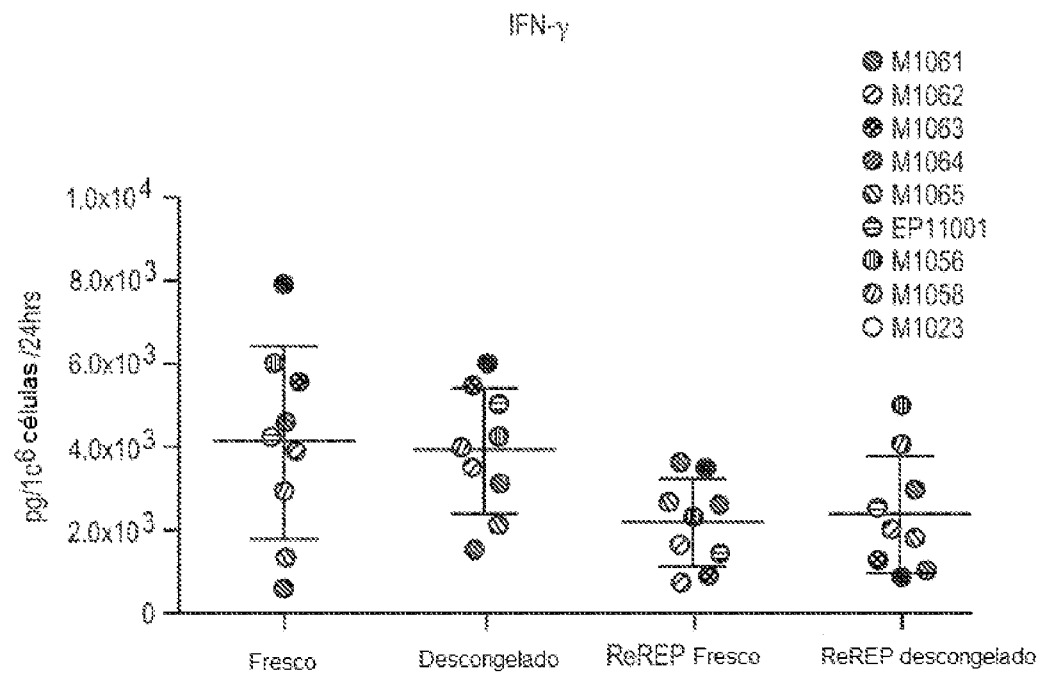


Figura 35

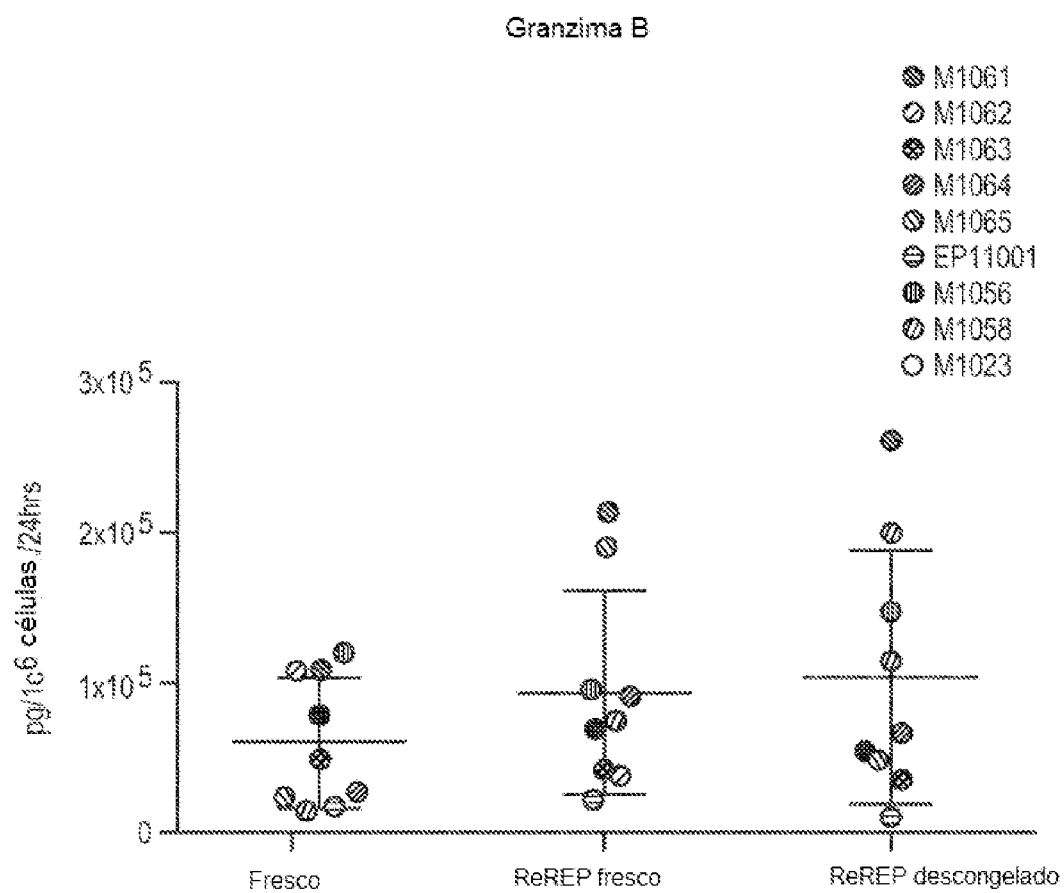


Figura 36

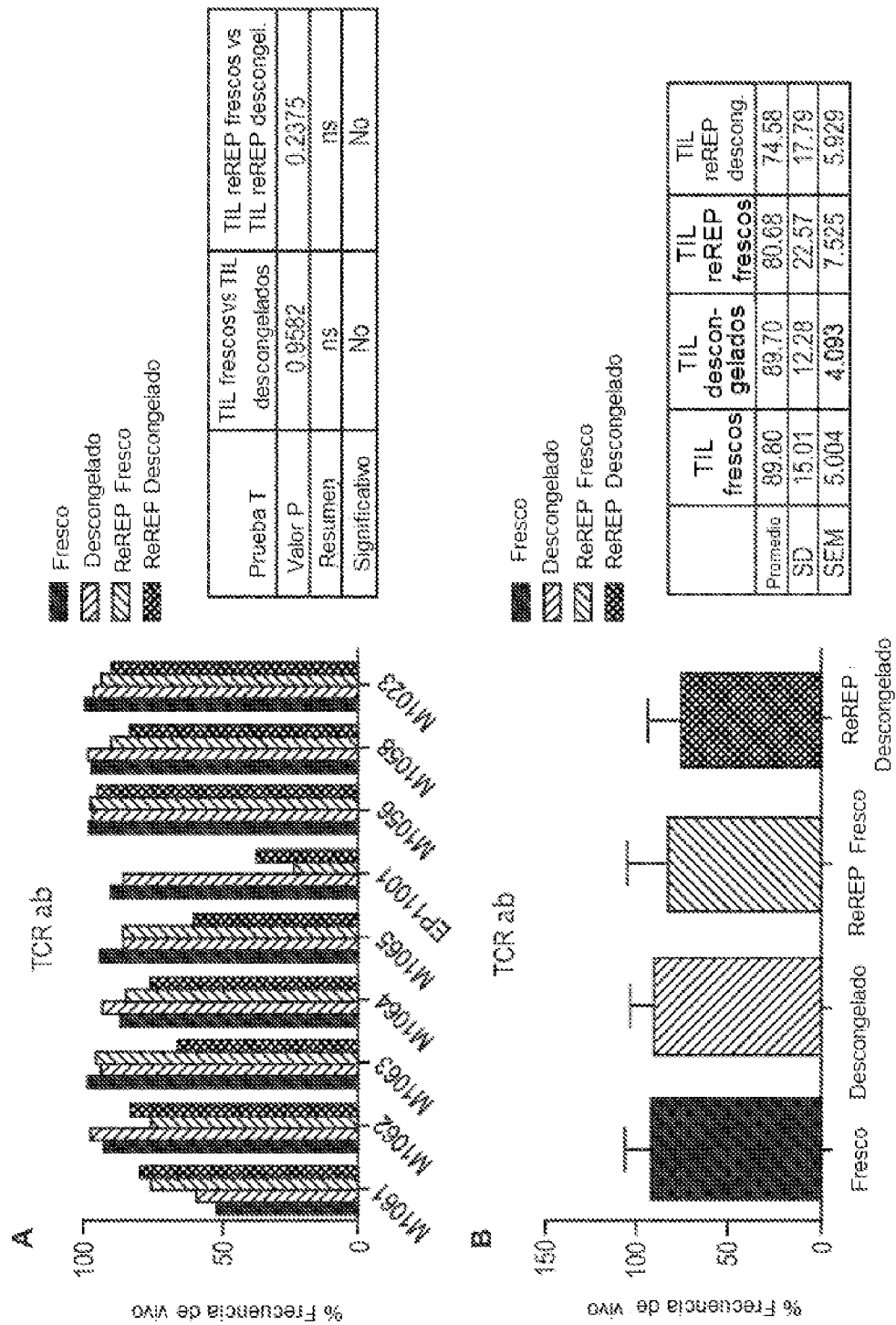


Figura 37

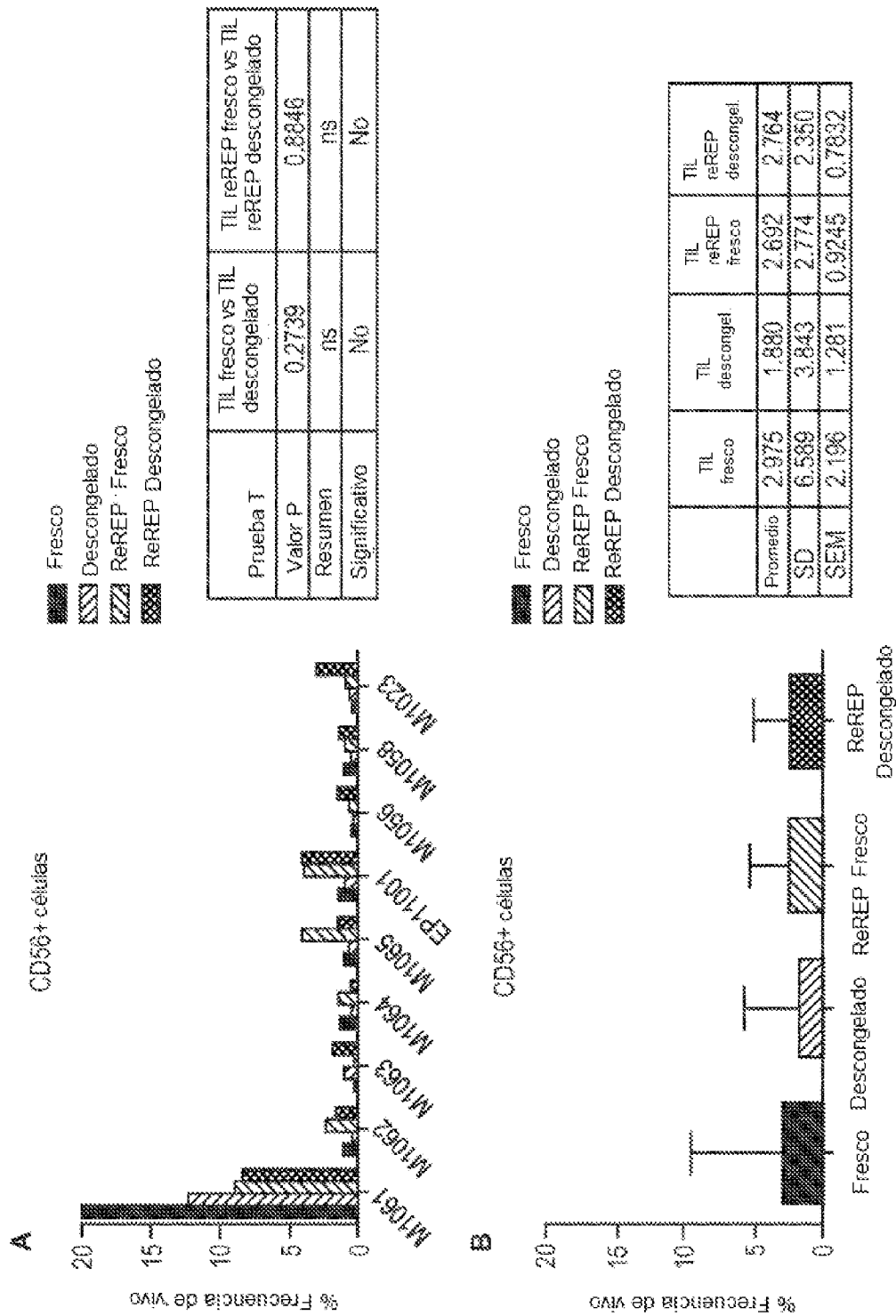


Figura 38

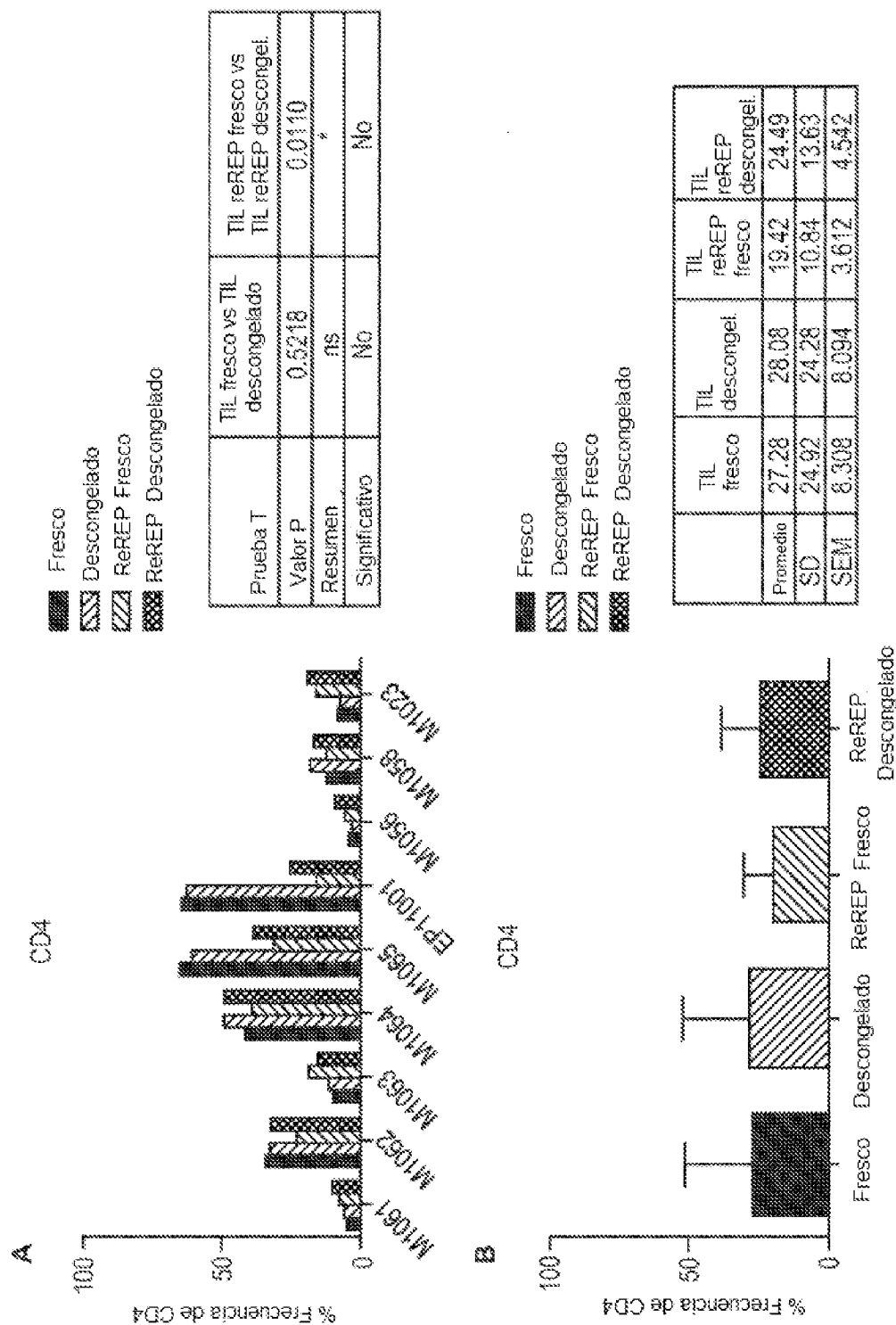


Figura 39

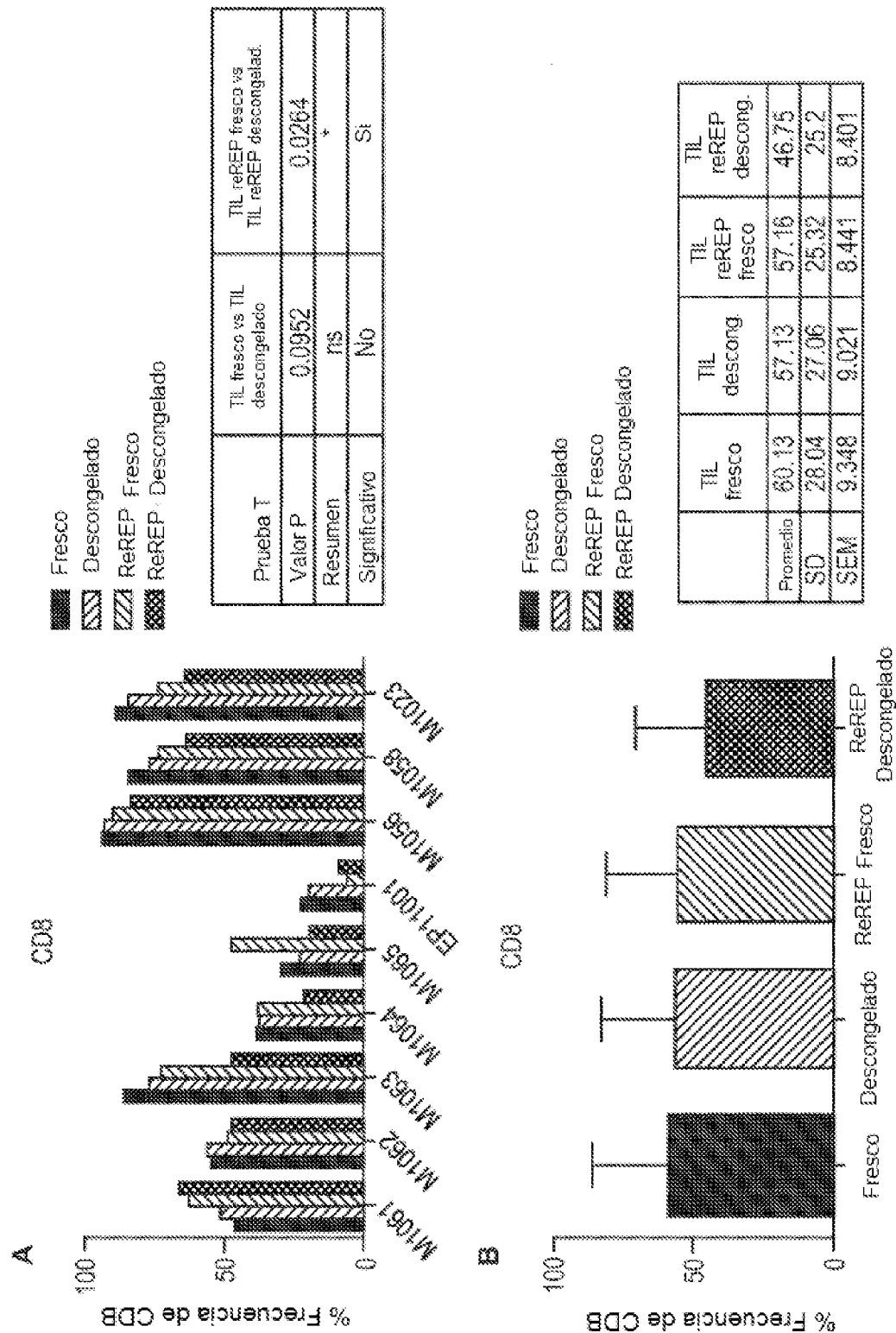


Figura 40

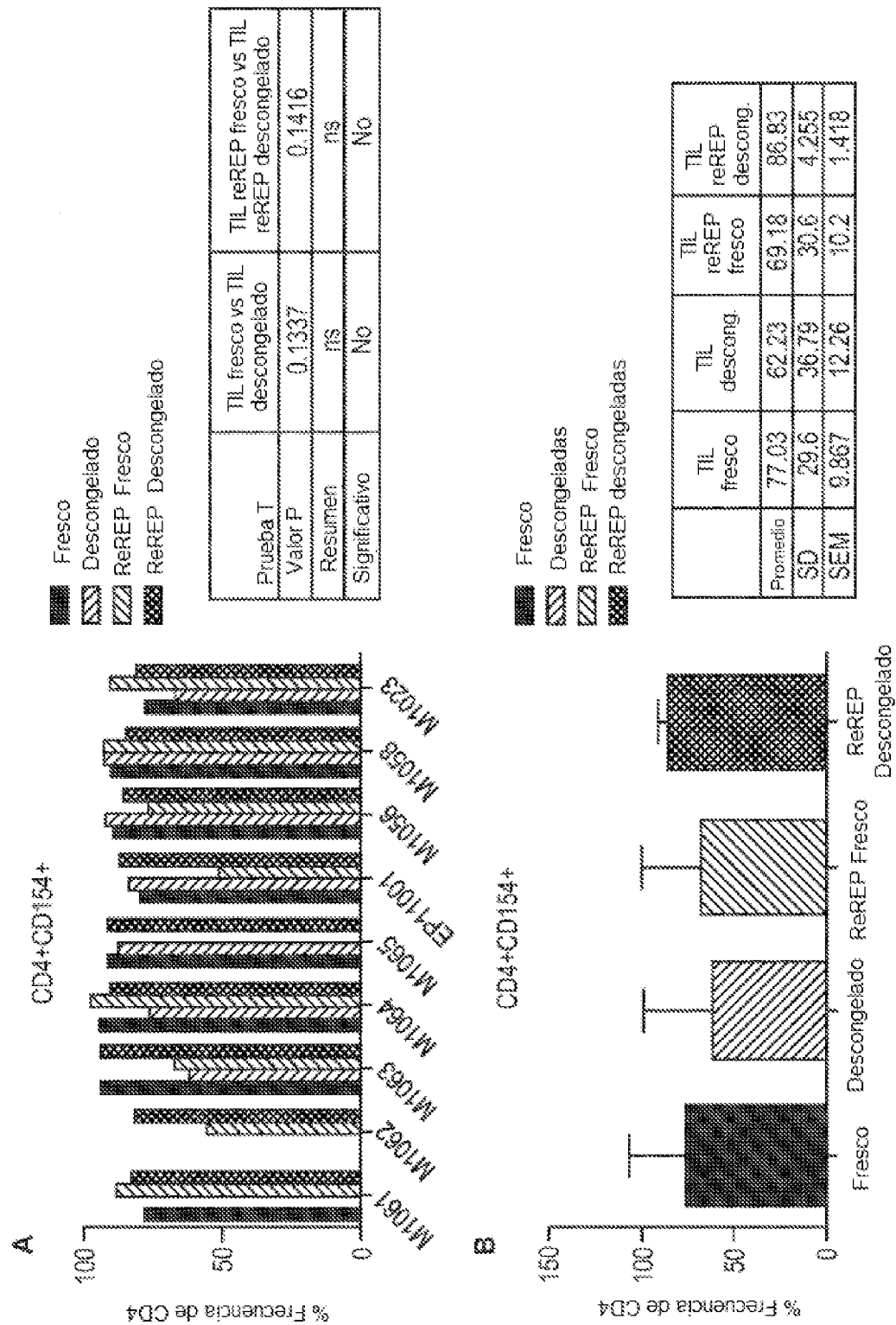


Figura 41

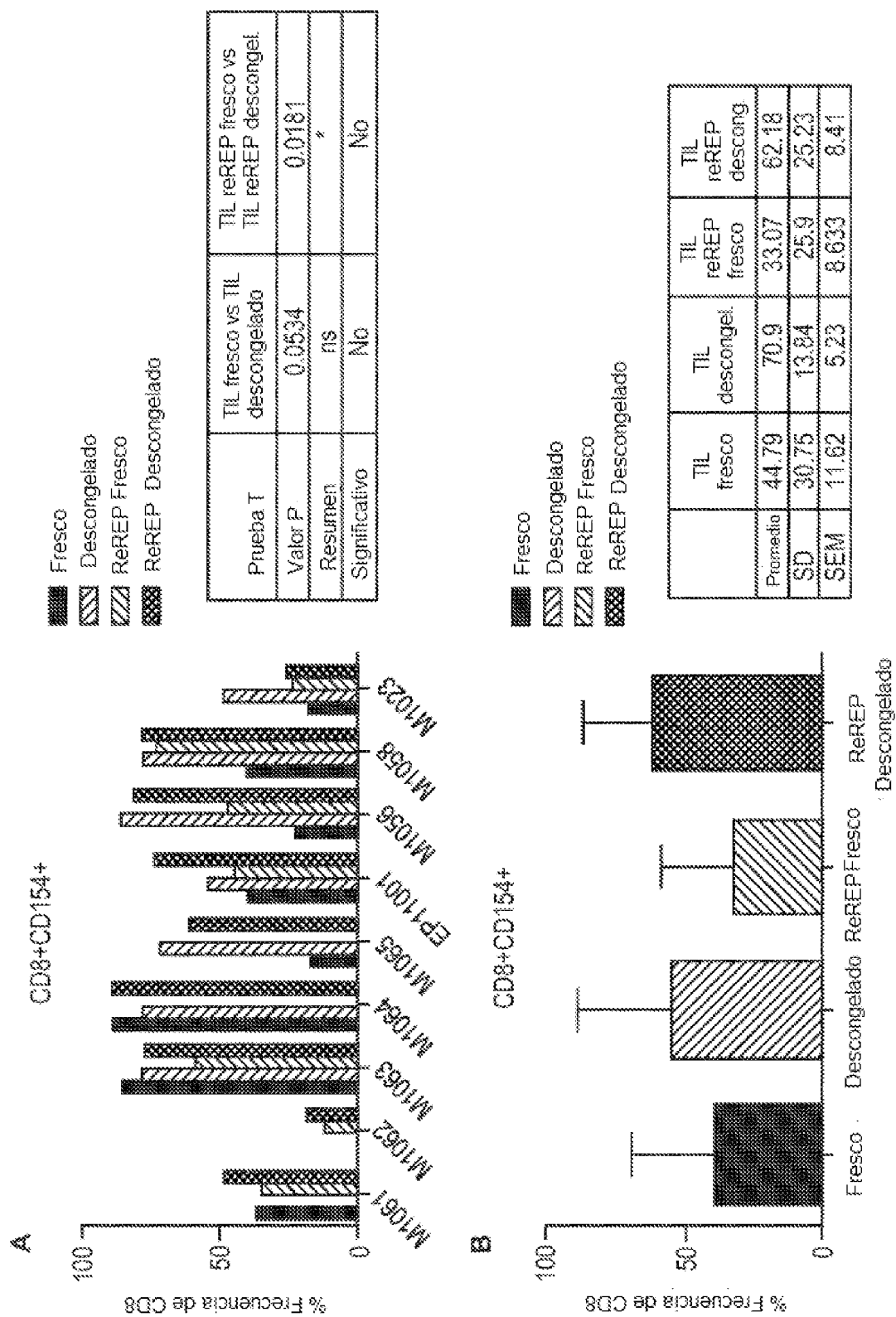


Figura 42

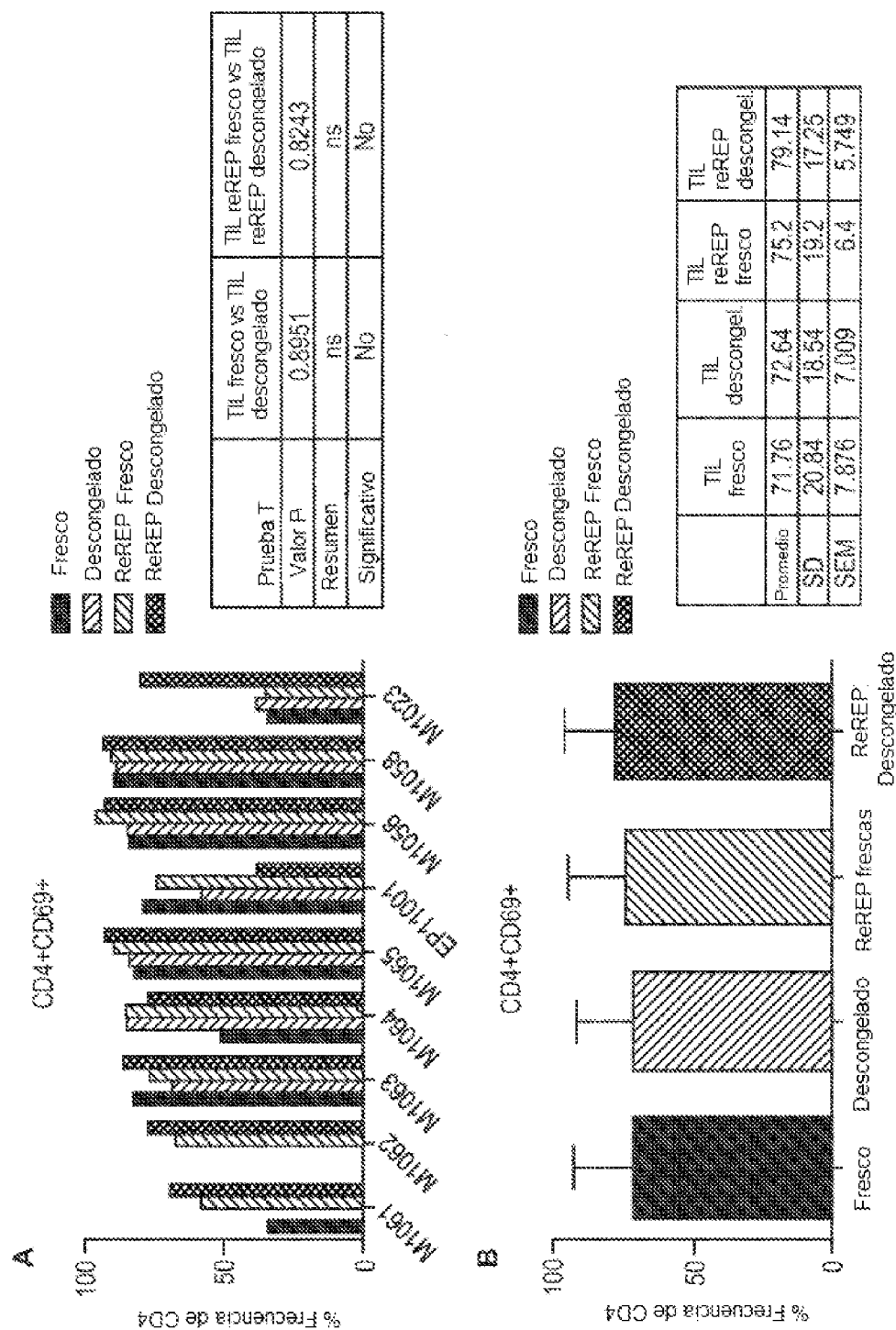


Figura 43

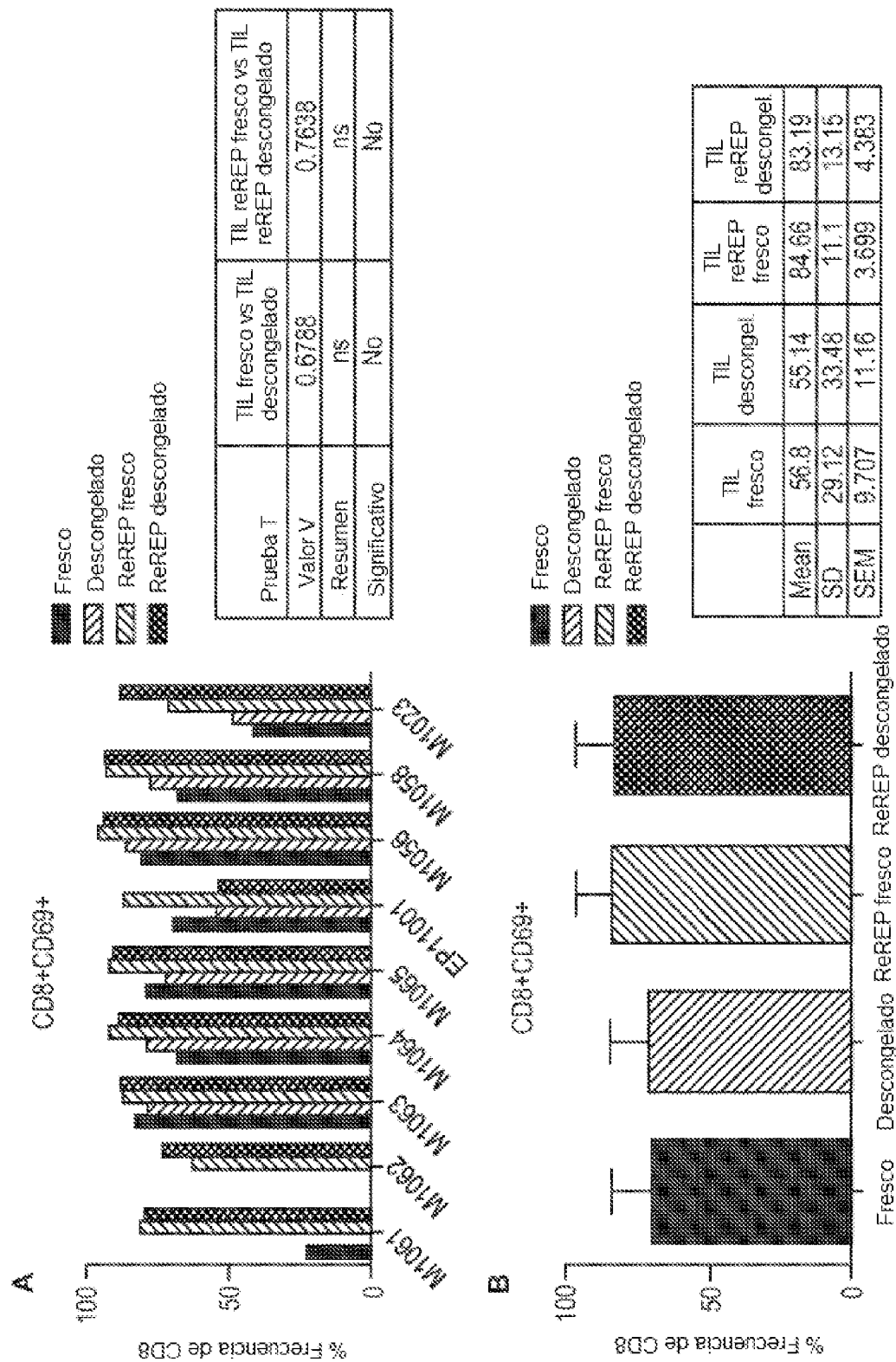


Figura 44

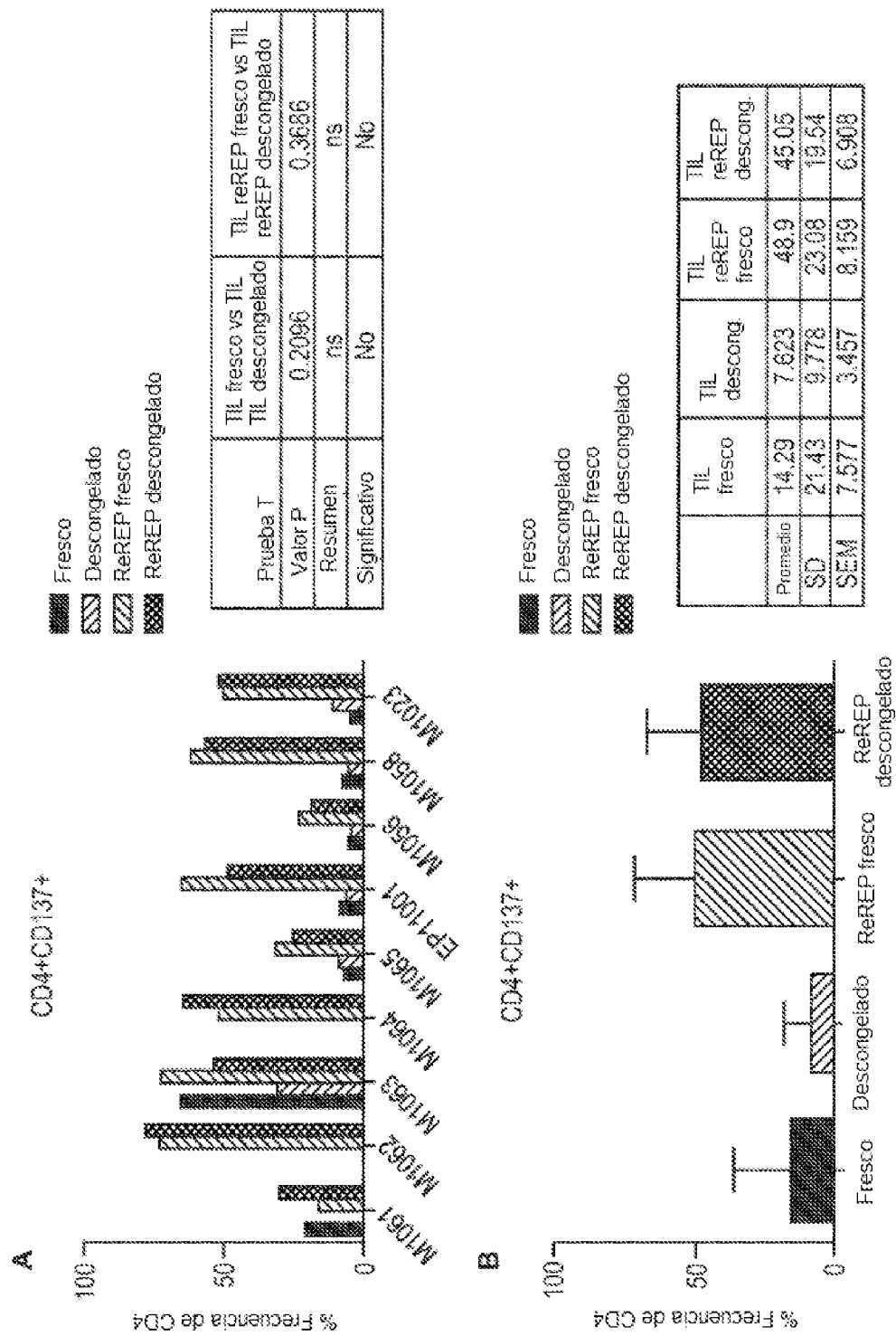


Figure 45

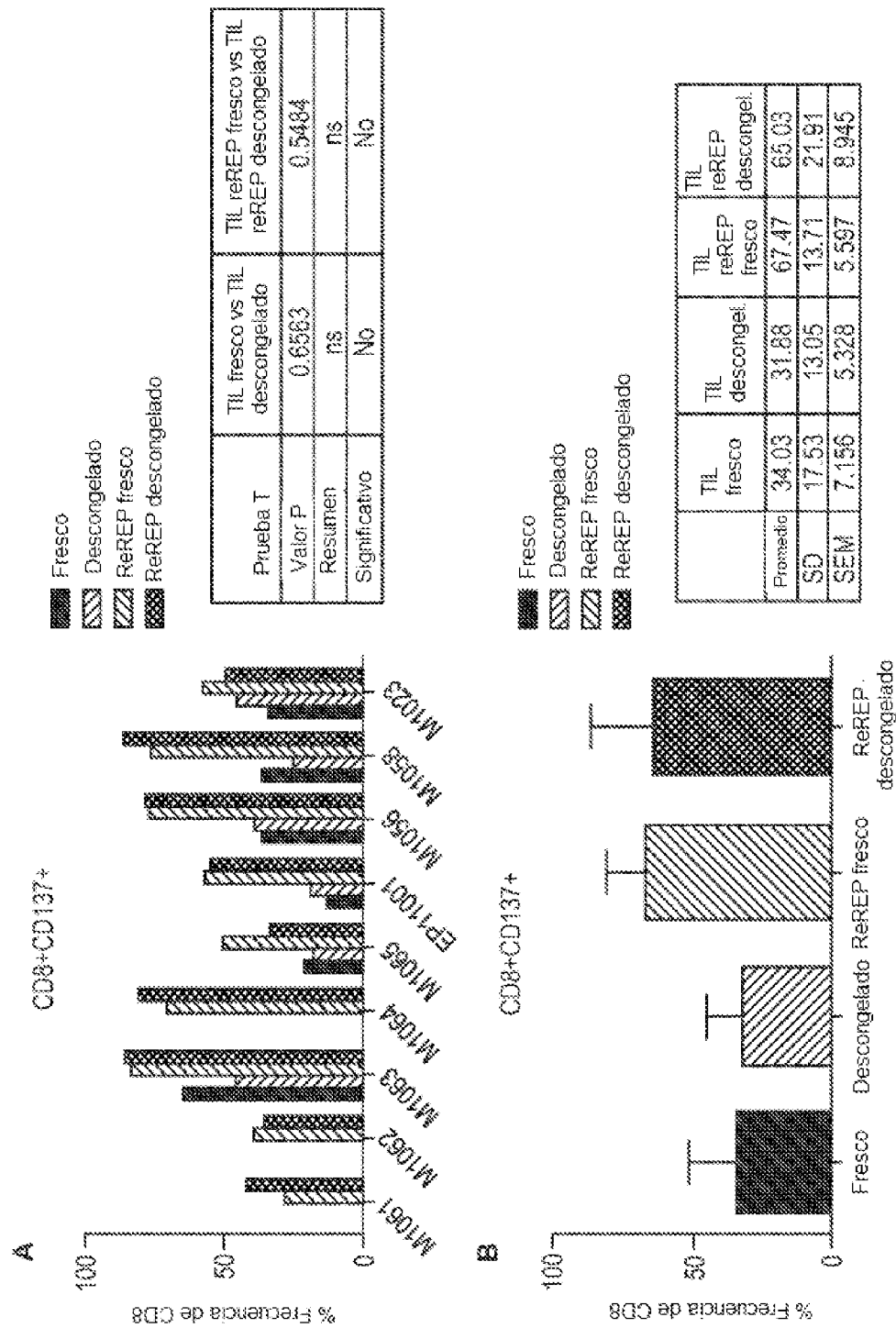


Figura 46

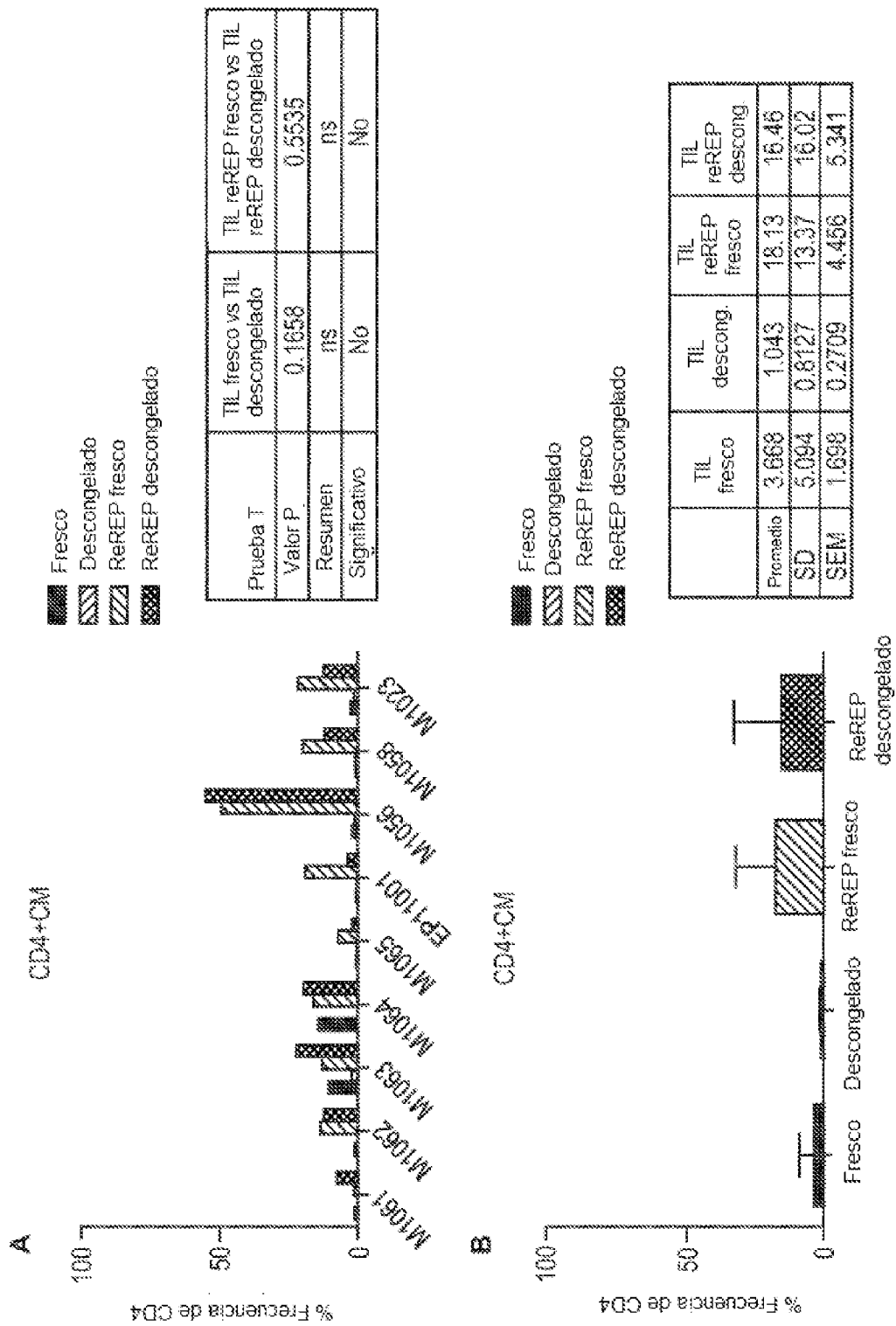


Figura 47

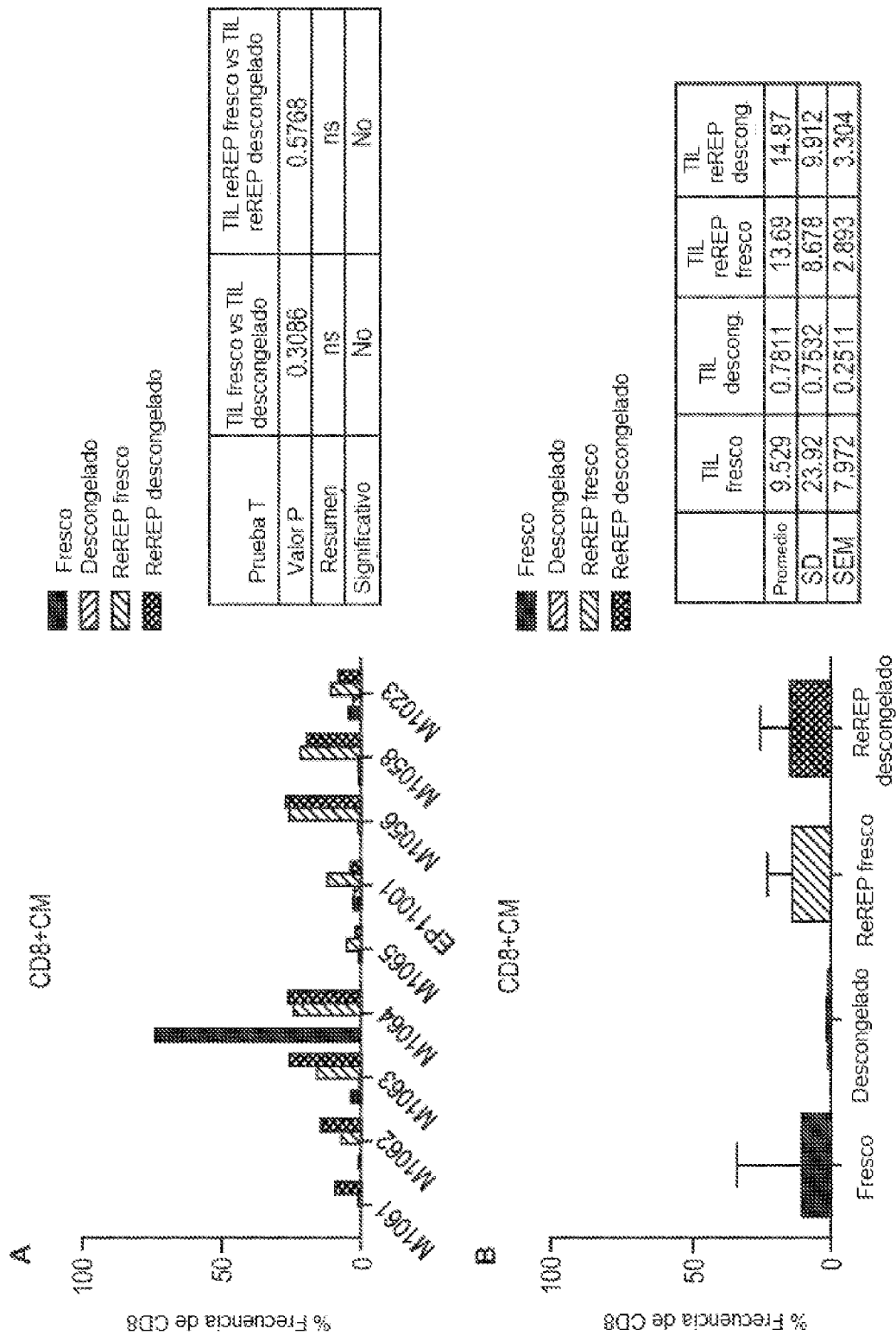


Figura 48

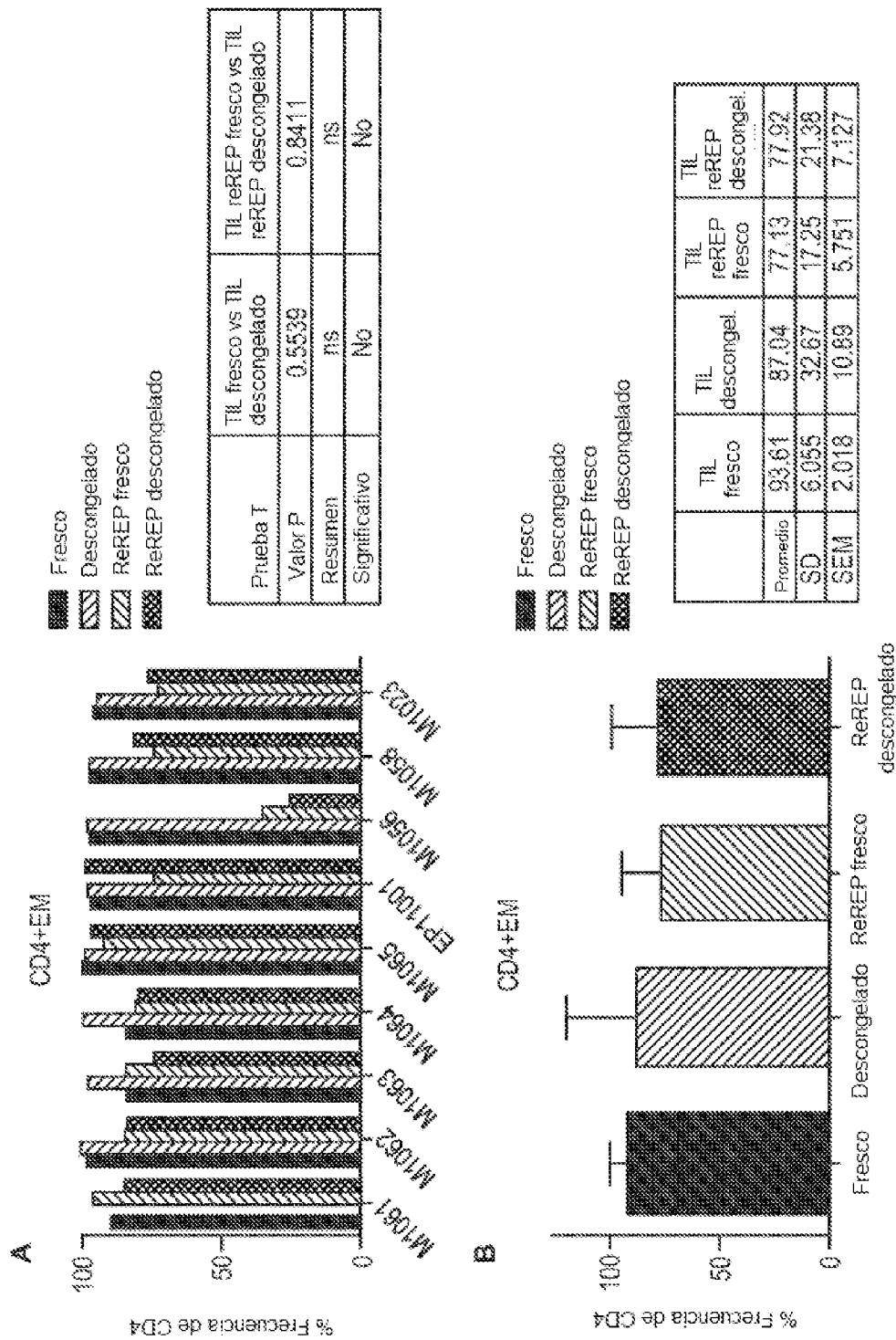


Figura 49

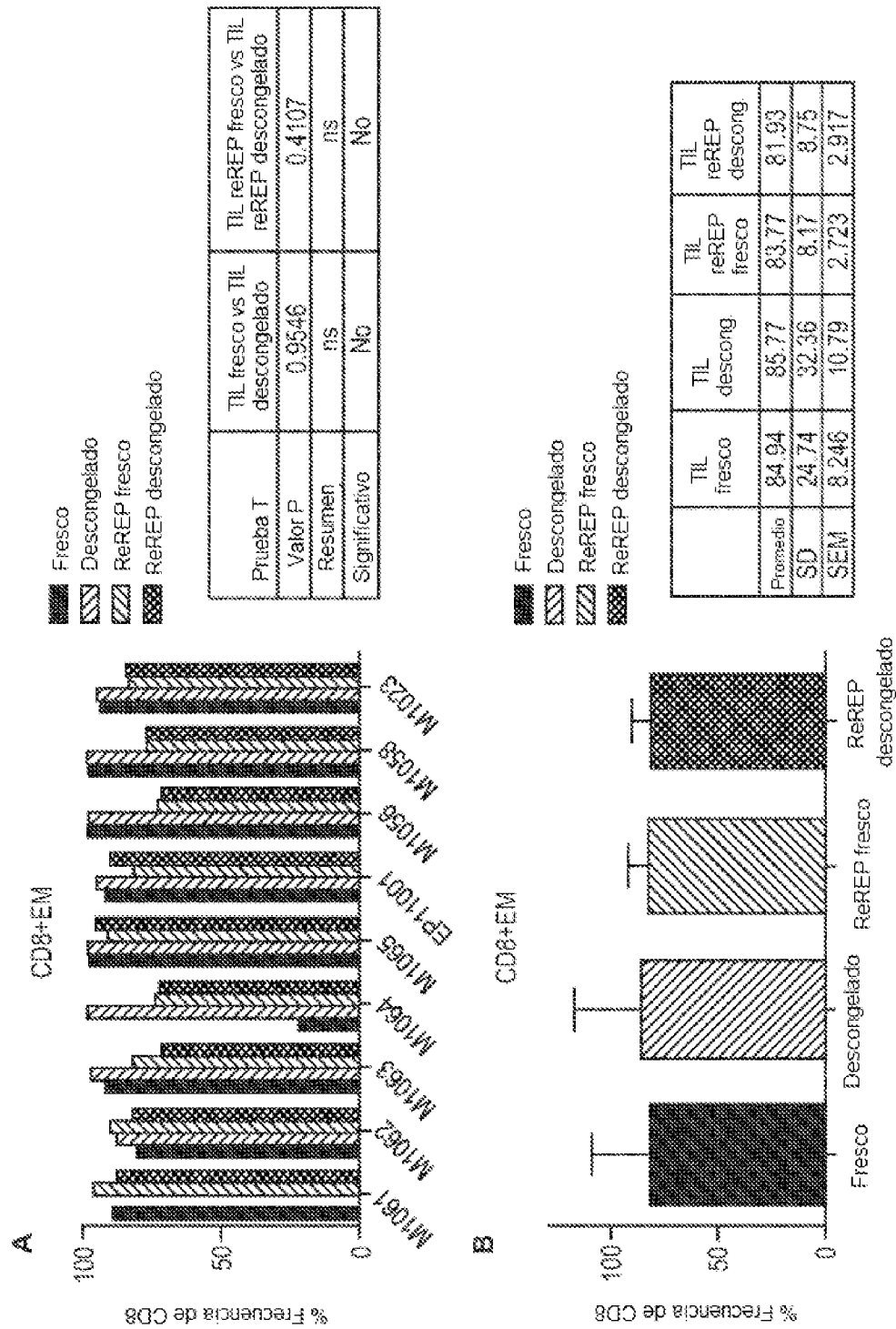


Figura 50

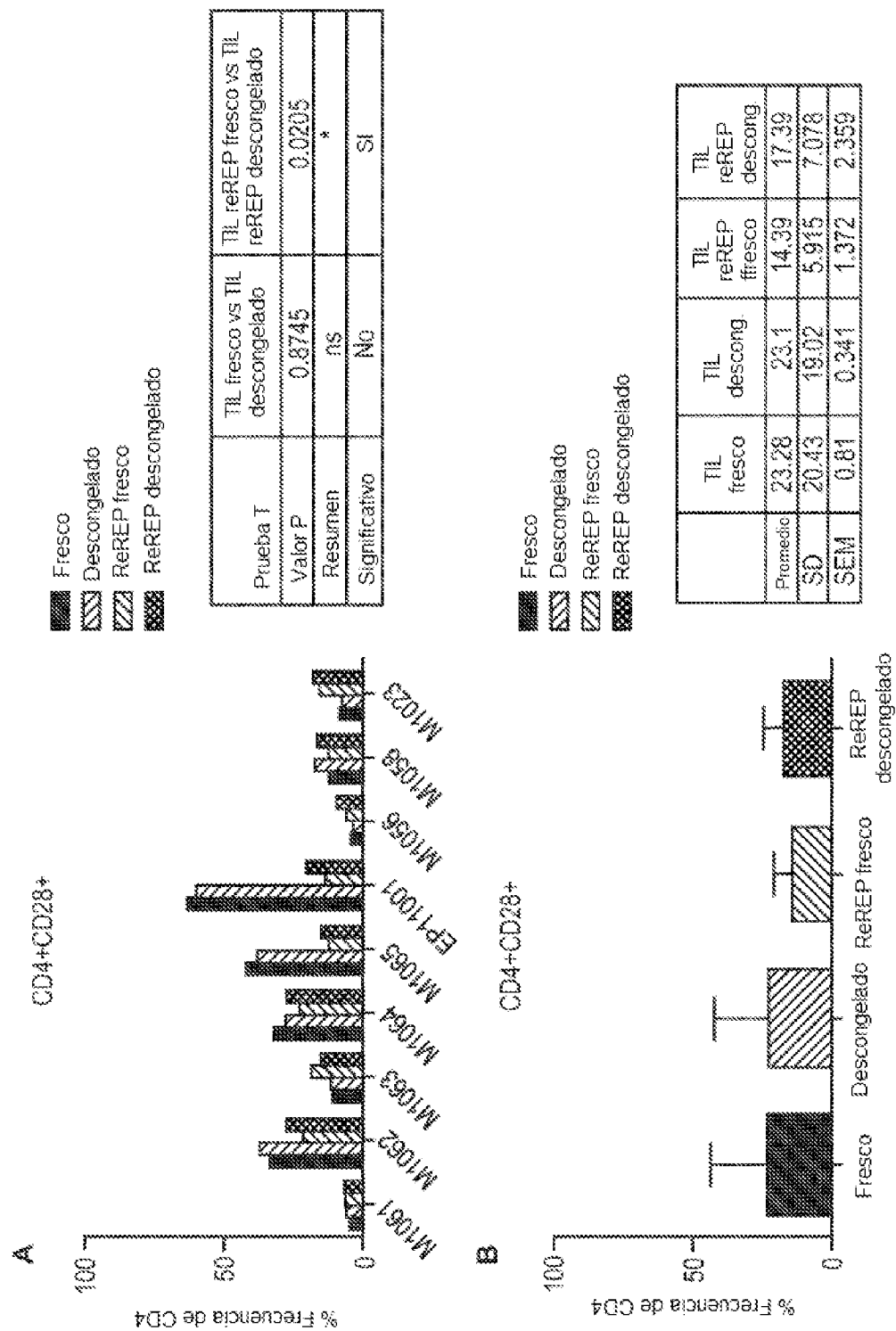


Figura 51

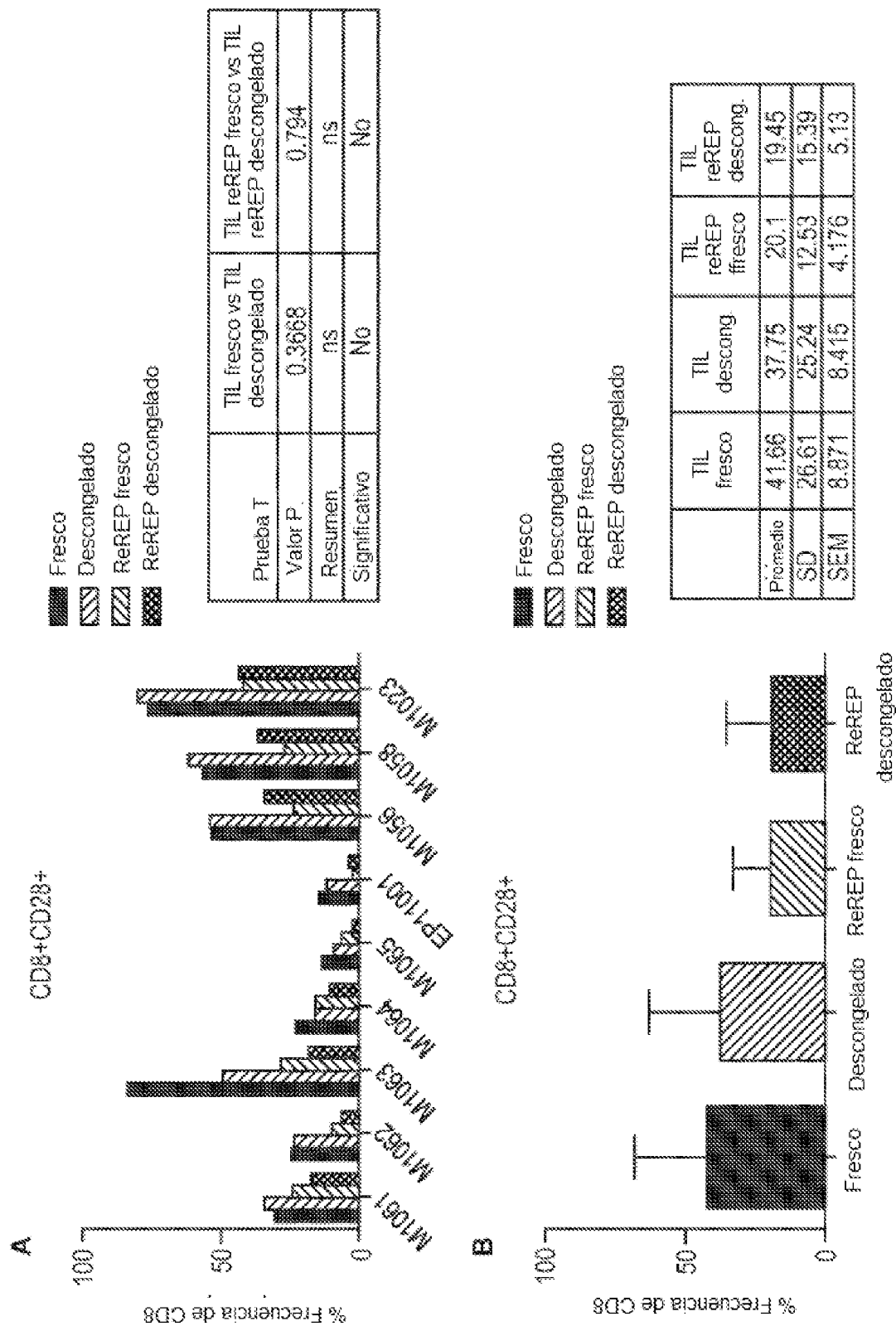


Figura 52

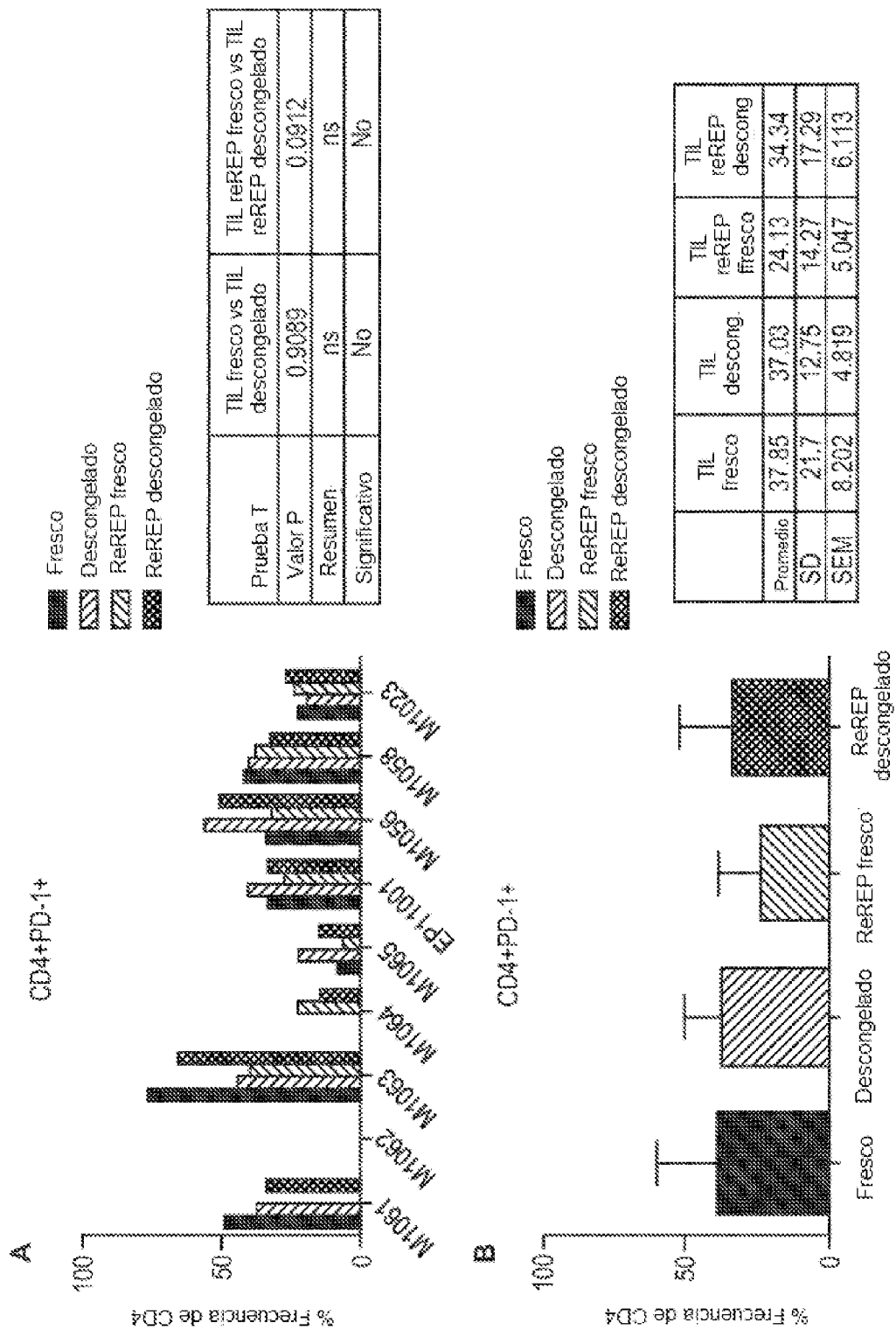


Figura 53

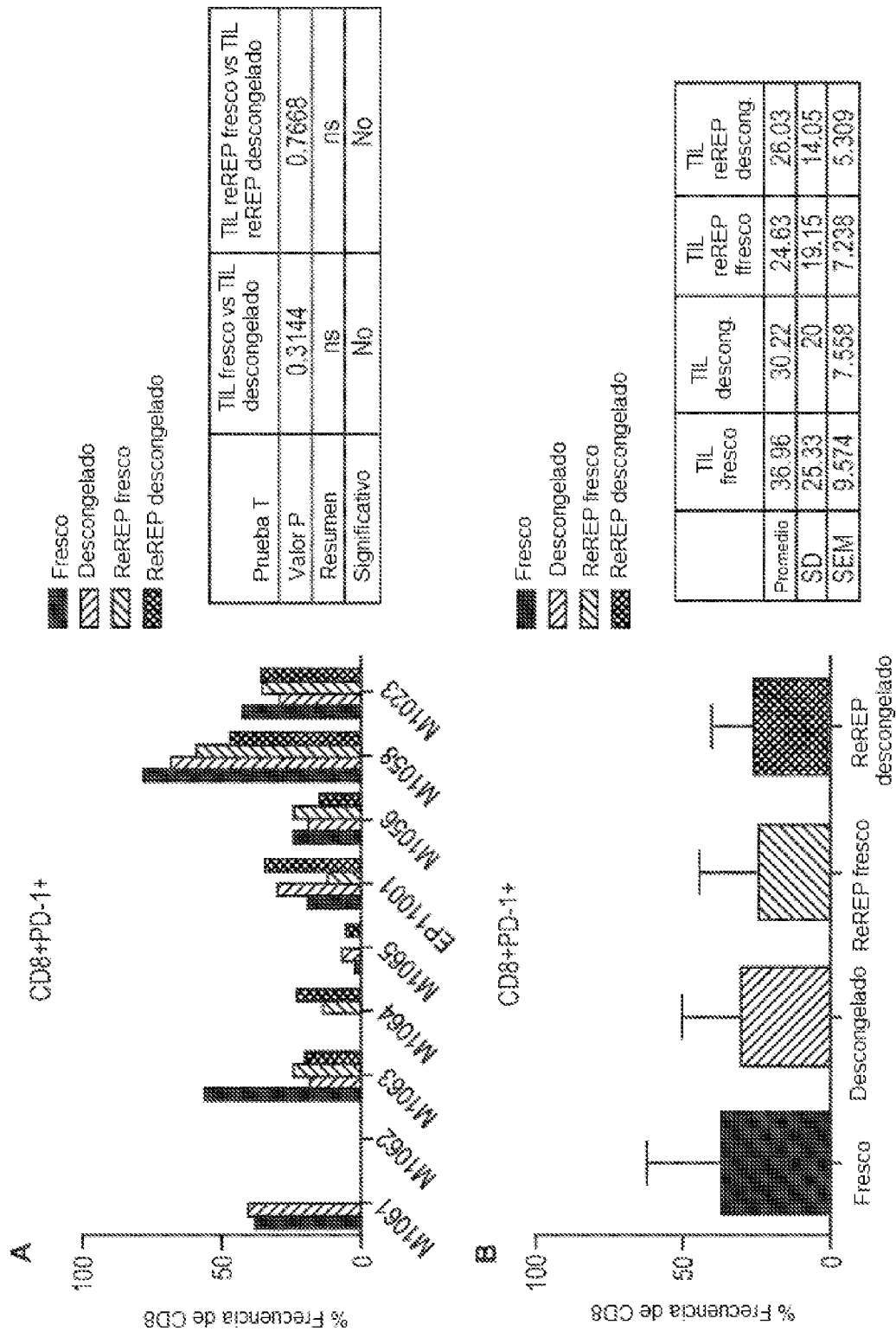


Figura 54

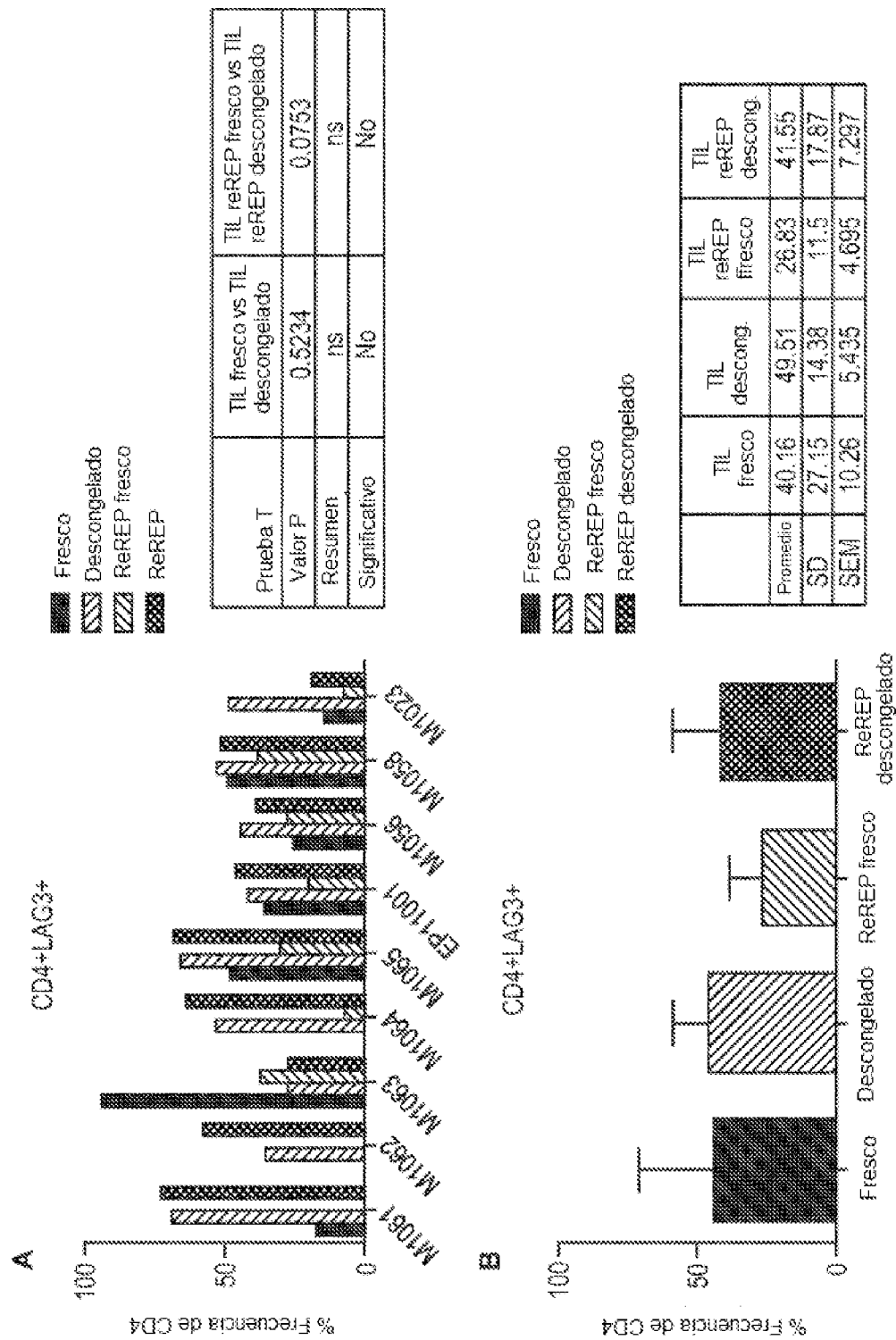


Figura 55

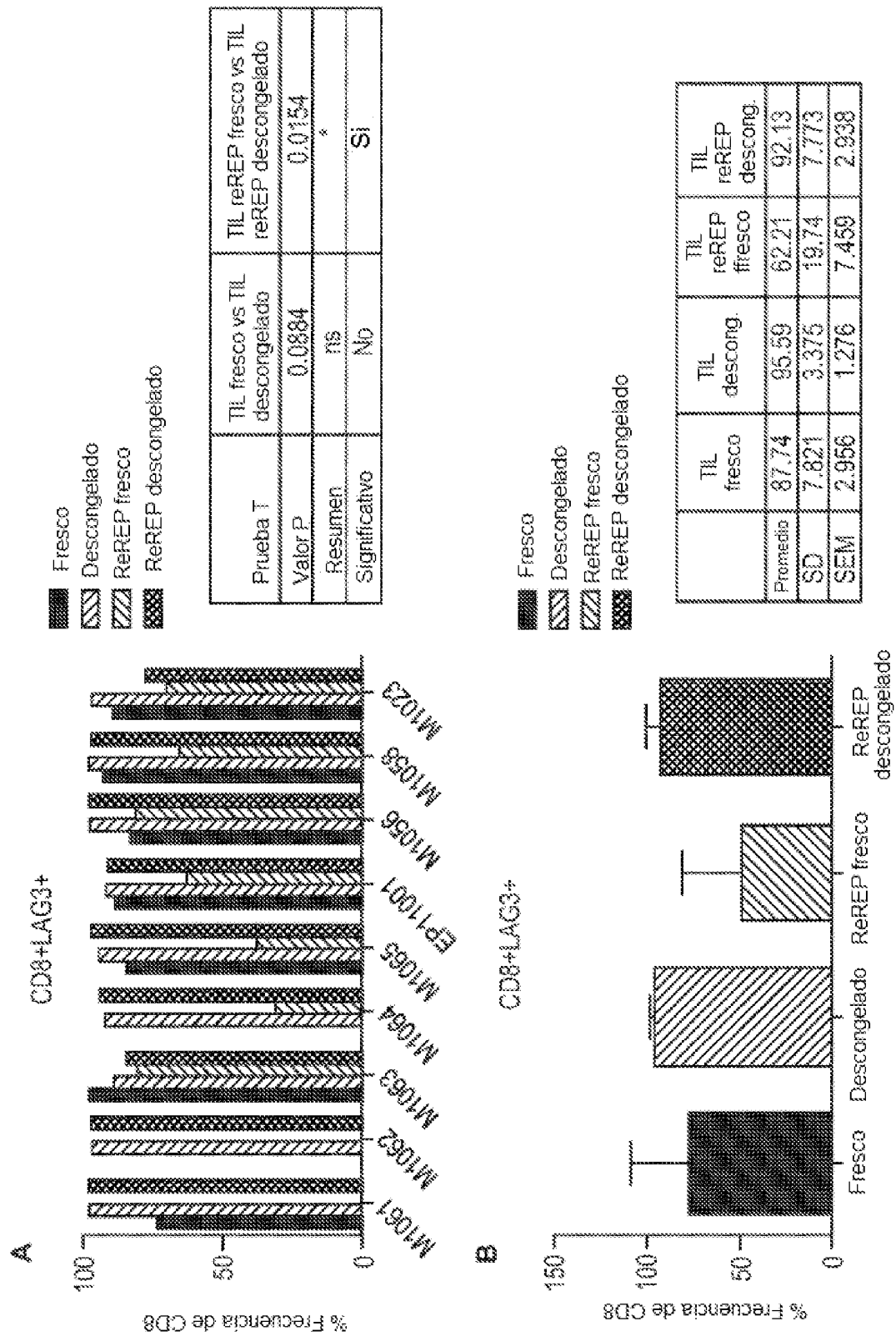


Figura 56

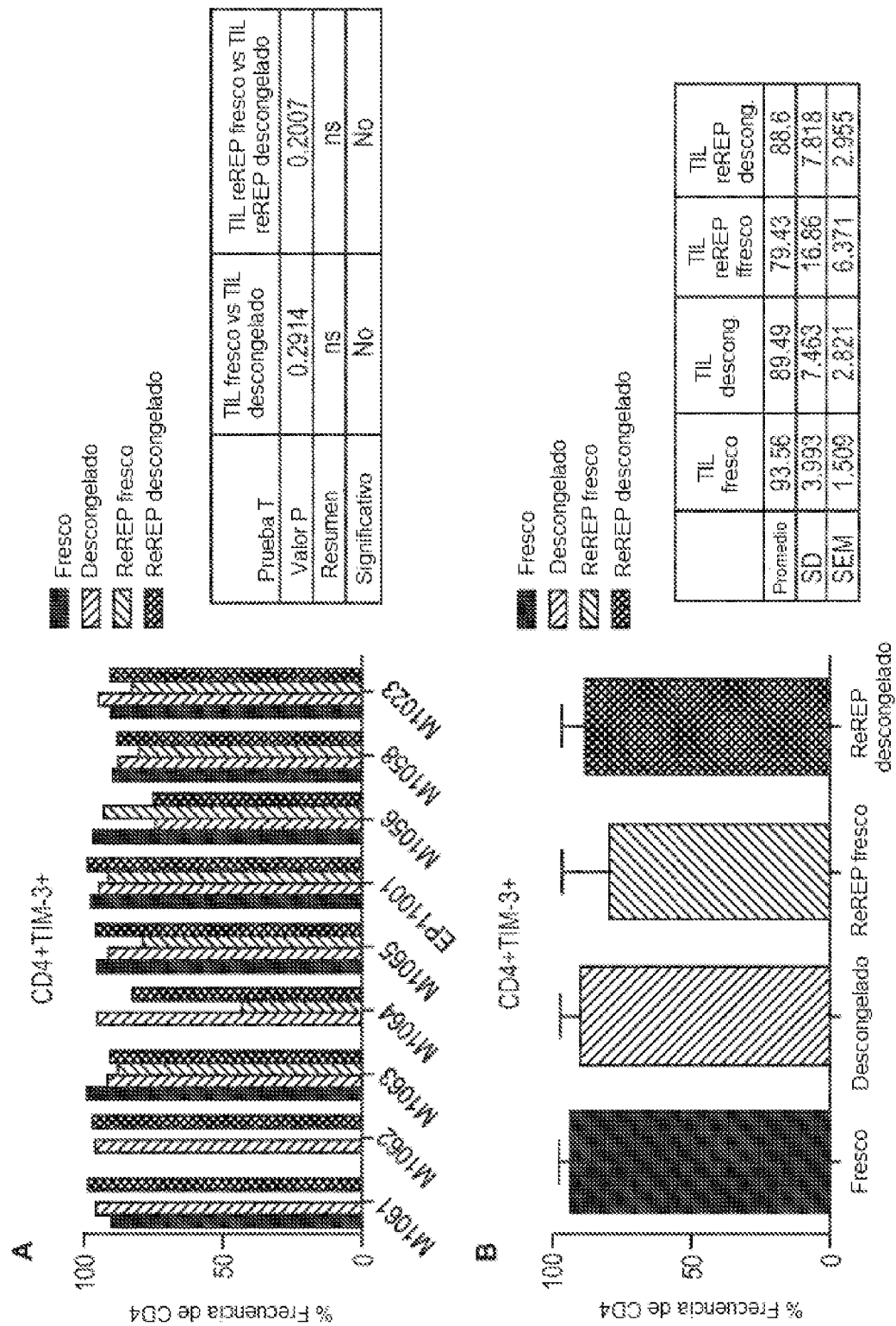


Figura 57

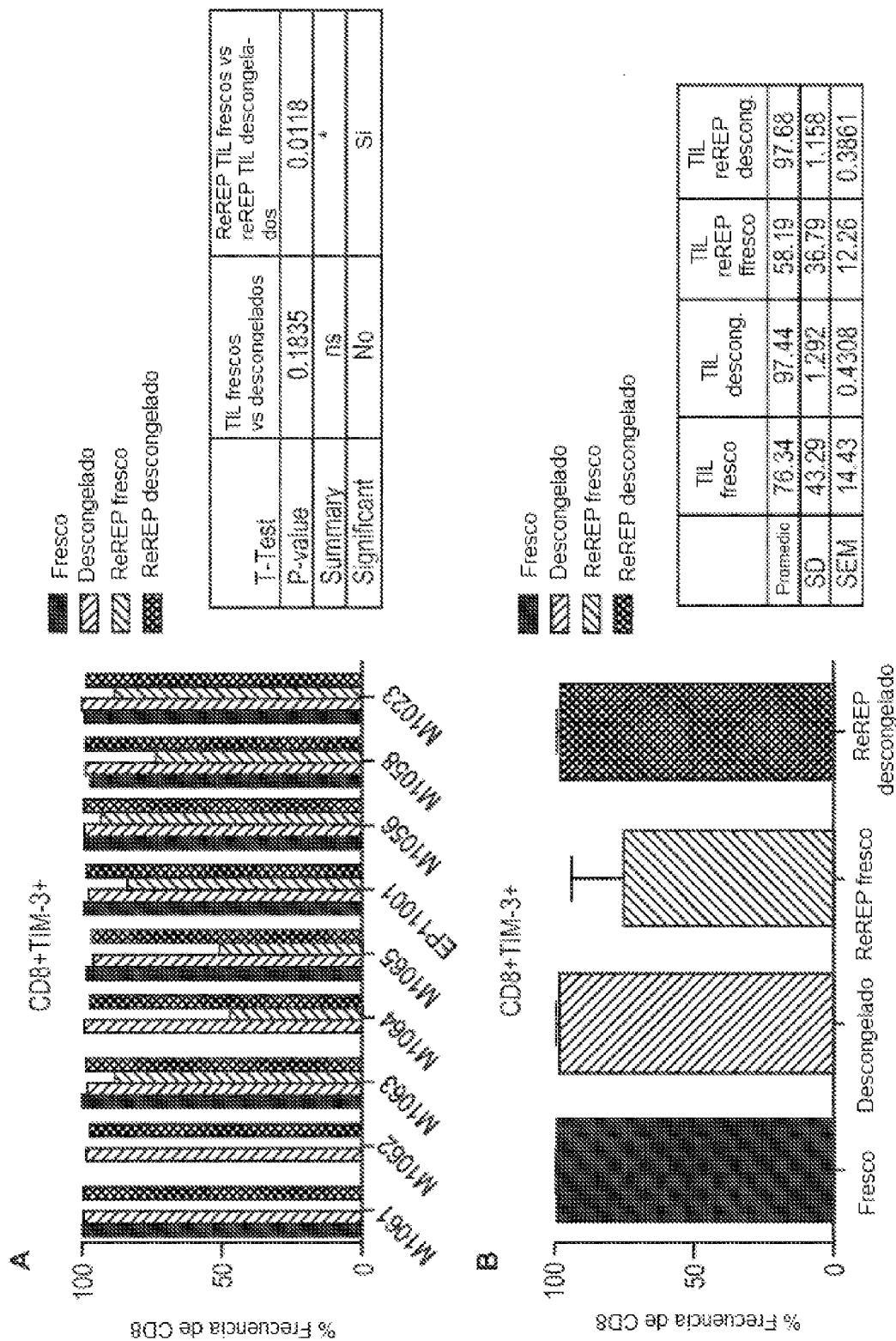


Figura 58

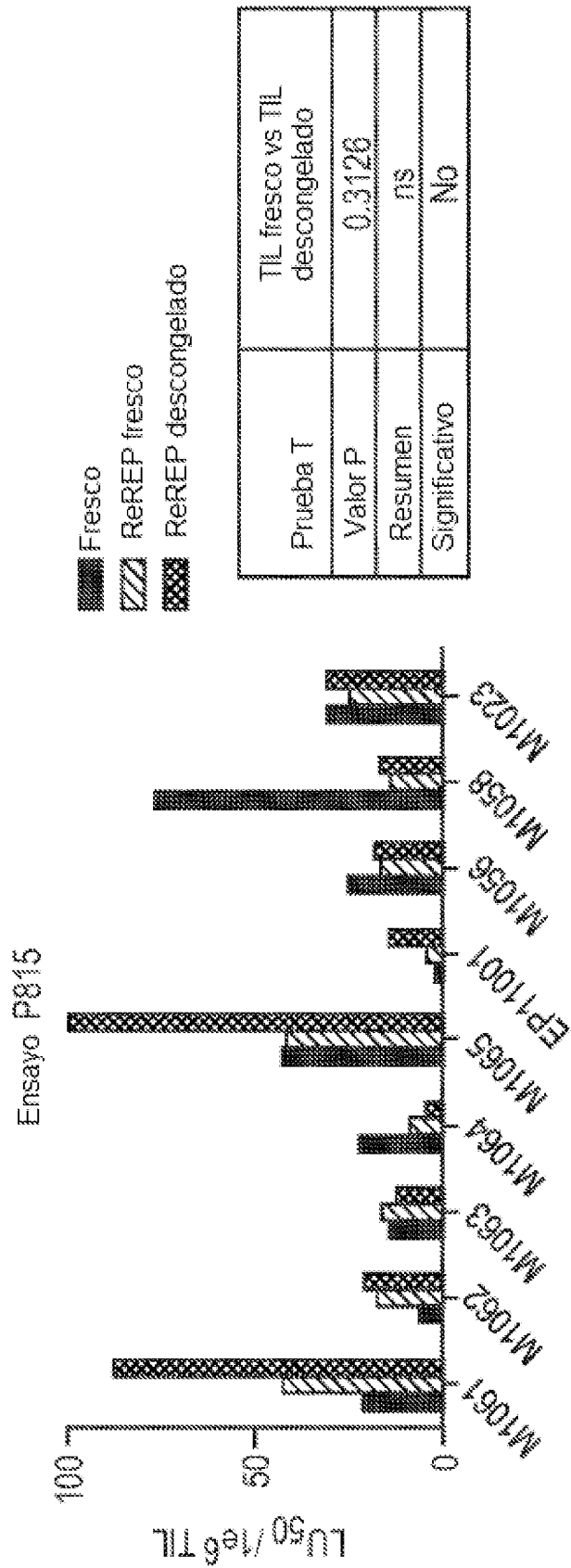


Figura 59

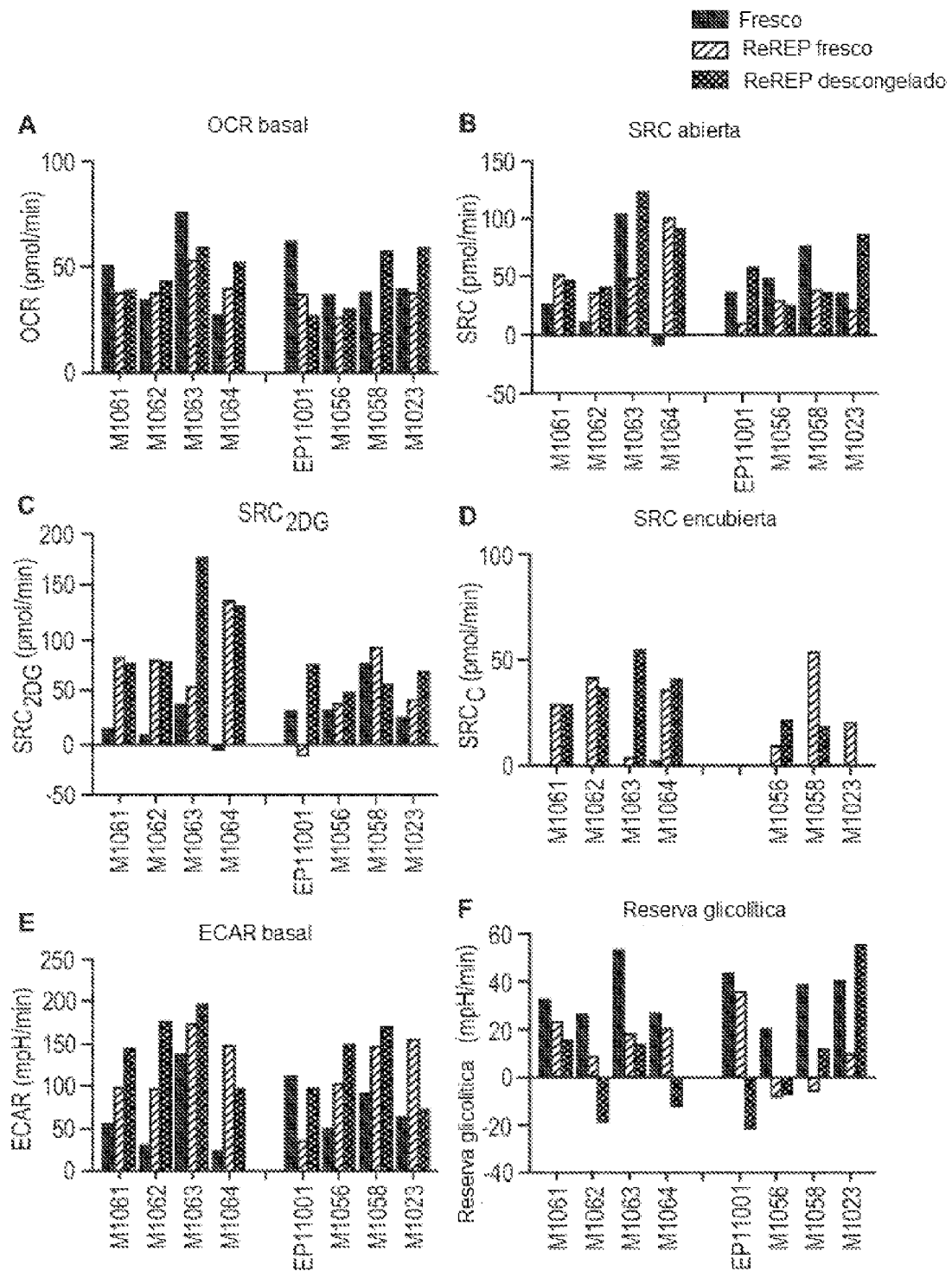


Figura 60

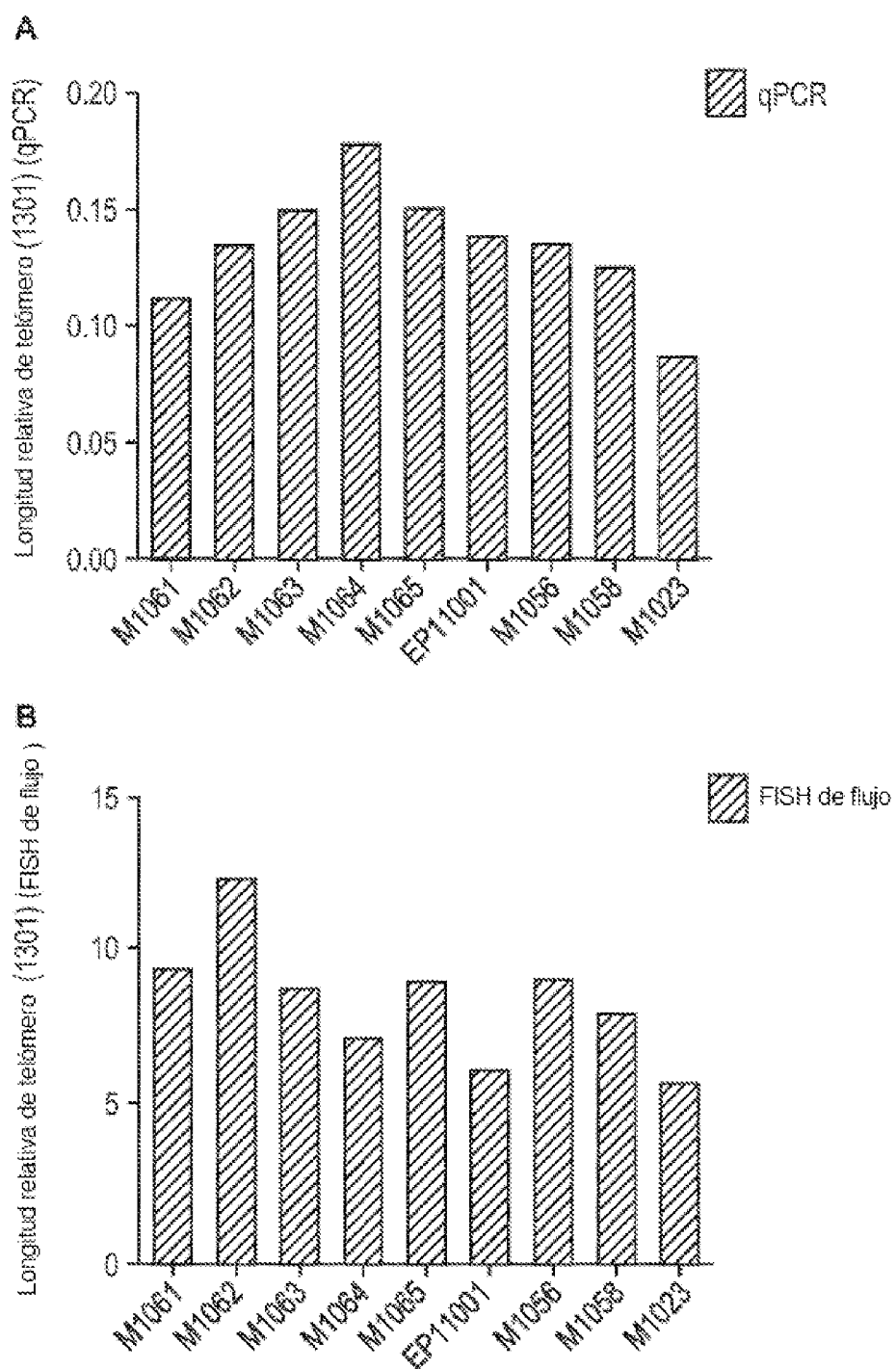
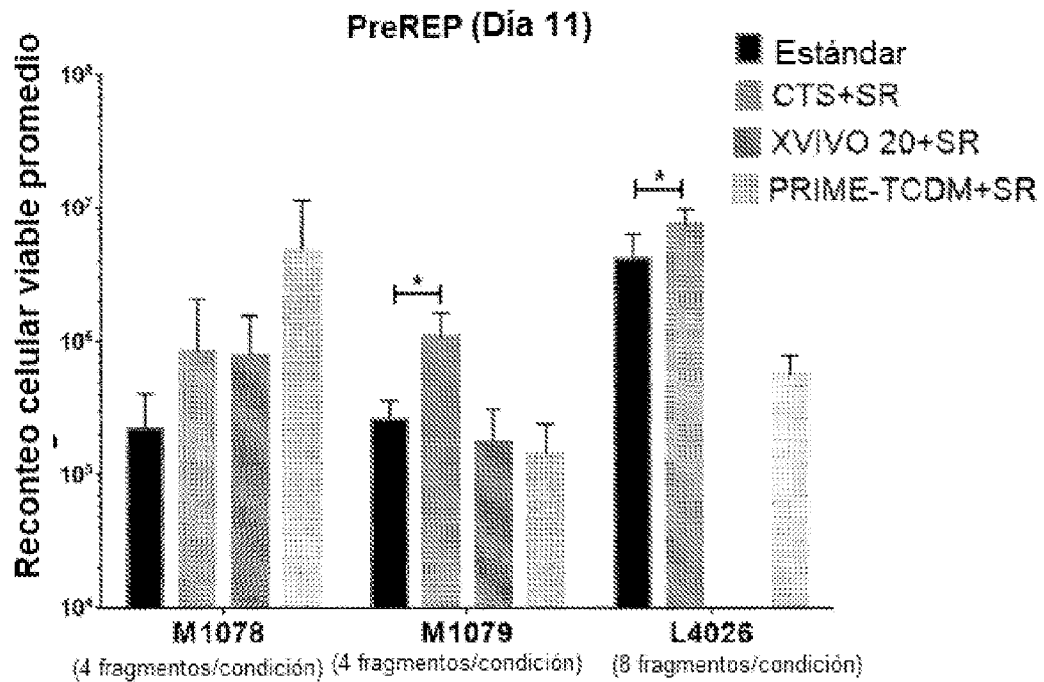


Figura 61

Figura 62

A)



B)

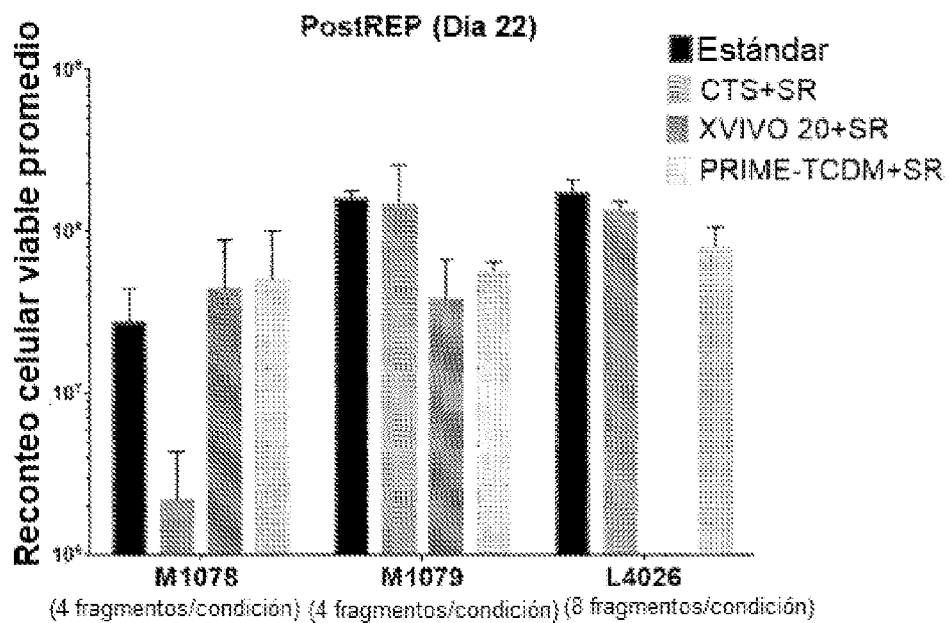


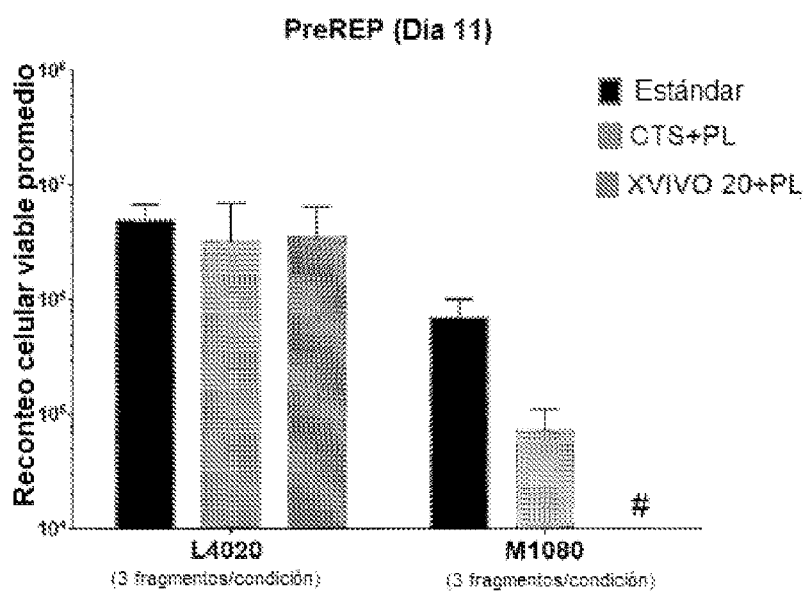
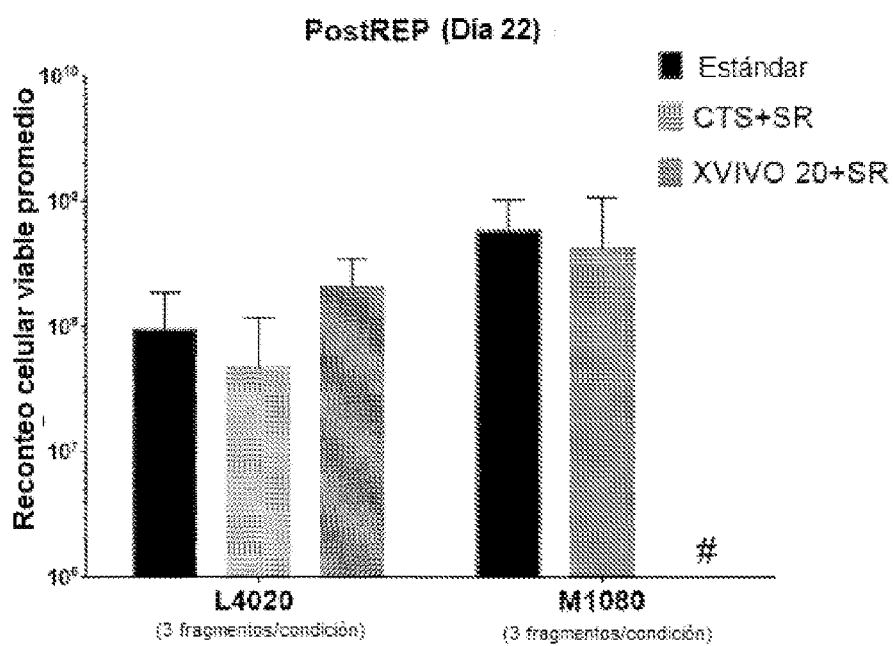
Figura 63**A)****B)**

Figura 64A

A)

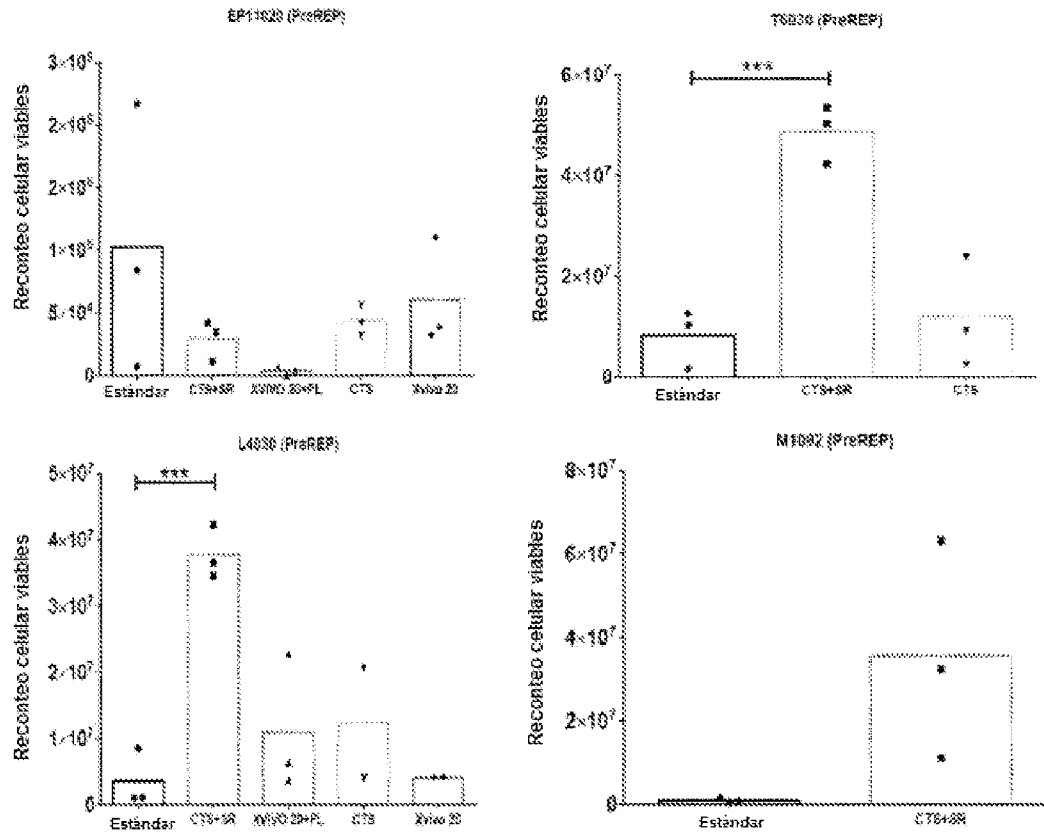


Figura 64B

8)

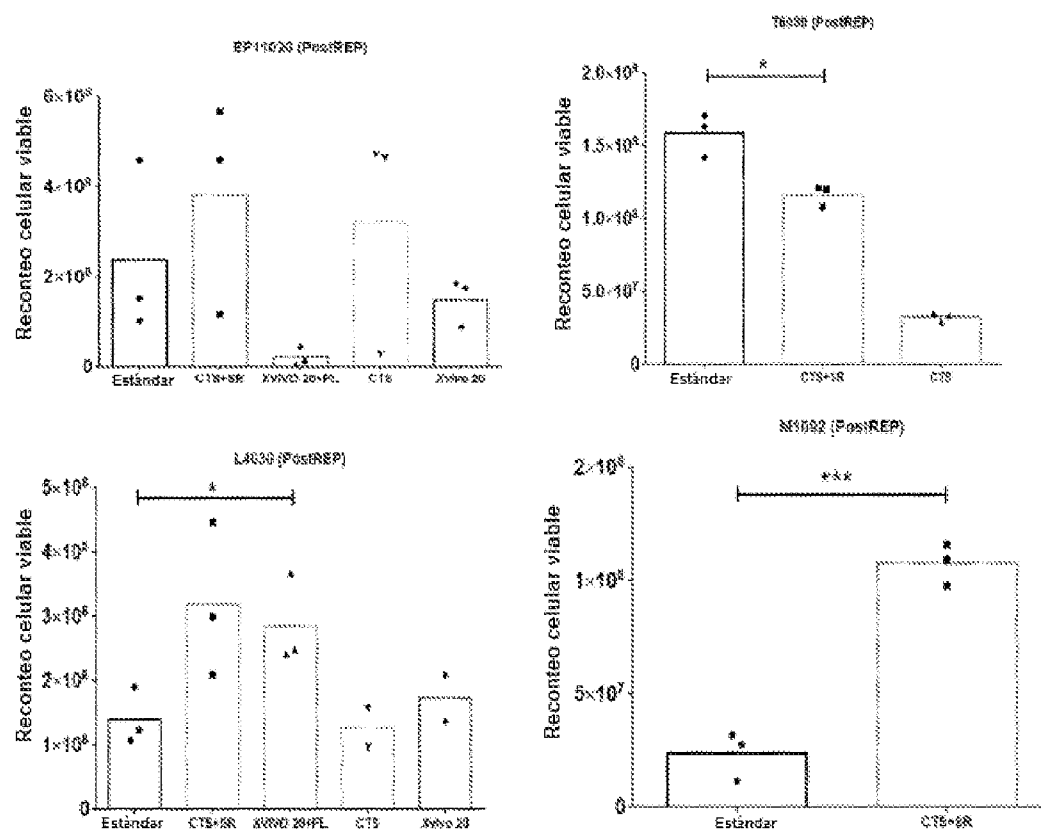
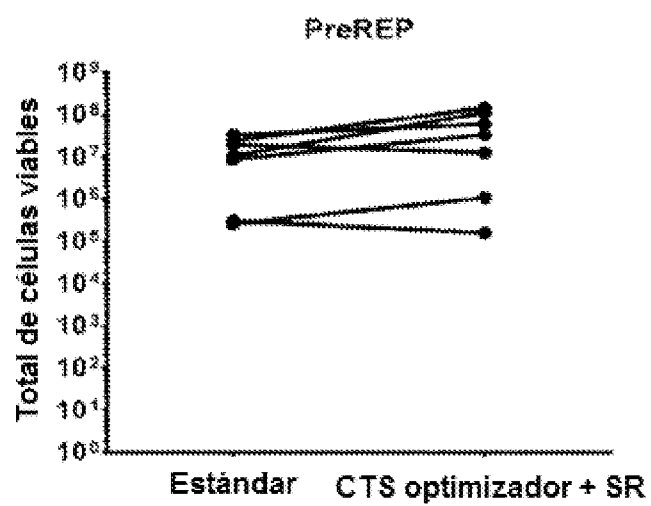


Figura 65A & 65B

A)



B)

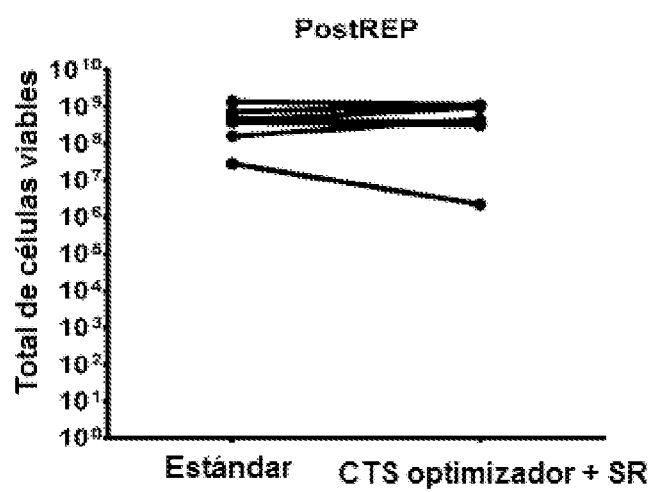


Figura 65C**c)**

	Reconteo de células pre-REP		Reconteo de células pos-REP	
	Estándar	CTS optimizador + SR	Estándar	CTS optimizador + SR
M1078	8.82E+07	3.38E+08	3.46E+09	2.73E+08
M1079	2.60E+06	1.09E+07	1.99E+10	5.81E+10
M1080				
L4020	1.98E+08	1.27E+08	4.75E+10	3.99E+10
L4026	1.68E+08	3.02E+08	5.83E+10	6.69E+10
L4030	7.05E+07	7.48E+08	2.83E+10	5.98E+10
EP11520	2.04E+06	1.08E+06	4.44E+10	7.14E+10
T8030	1.61E+08	9.64E+08	2.98E+10	2.16E+10
M1092	2.00E+07	7.08E+08	4.41E+09	2.02E+10

Figura 66

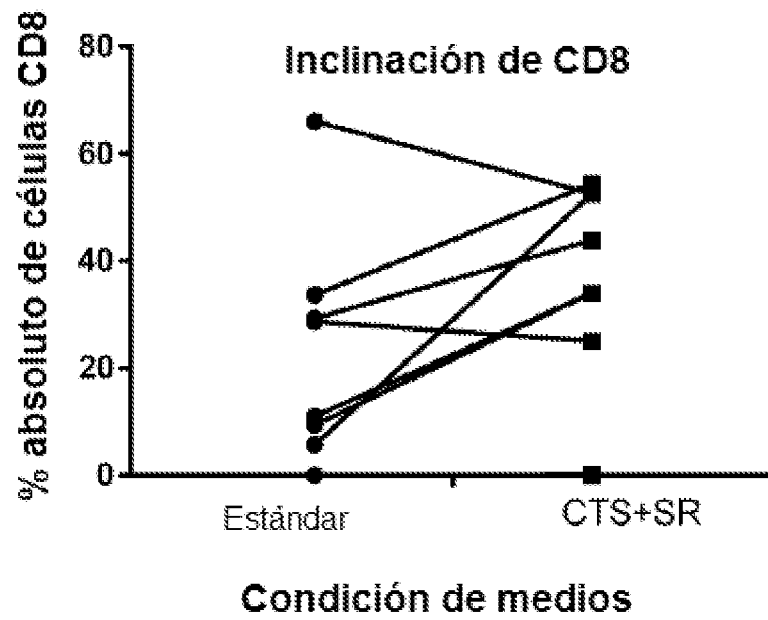
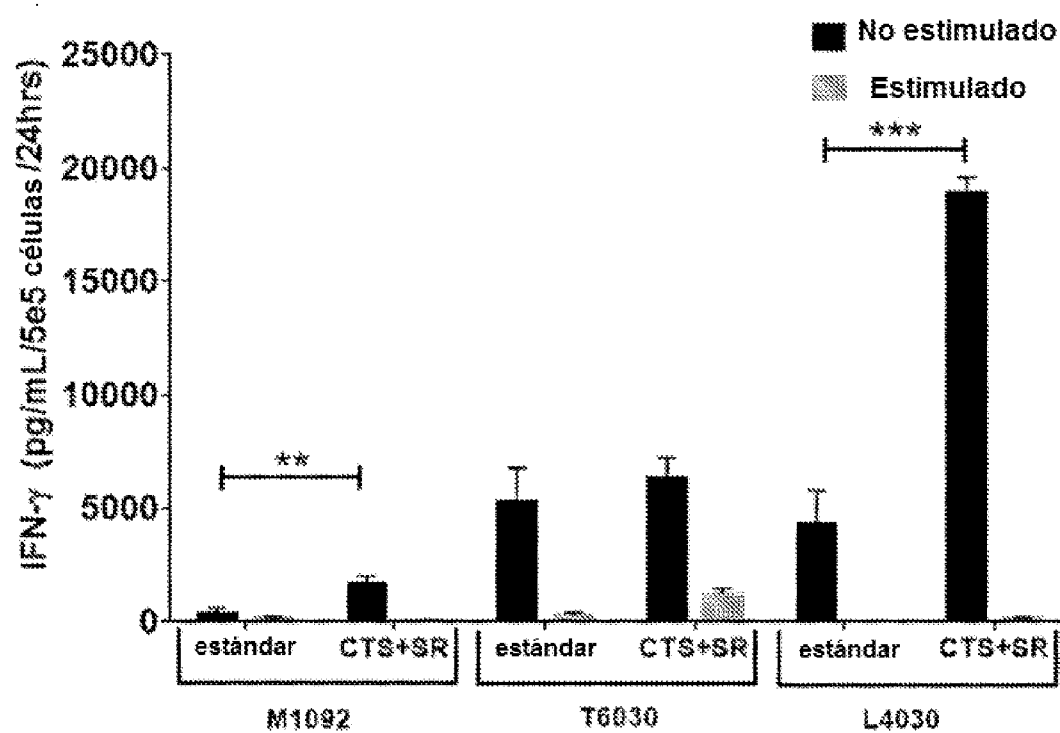


Figura 67

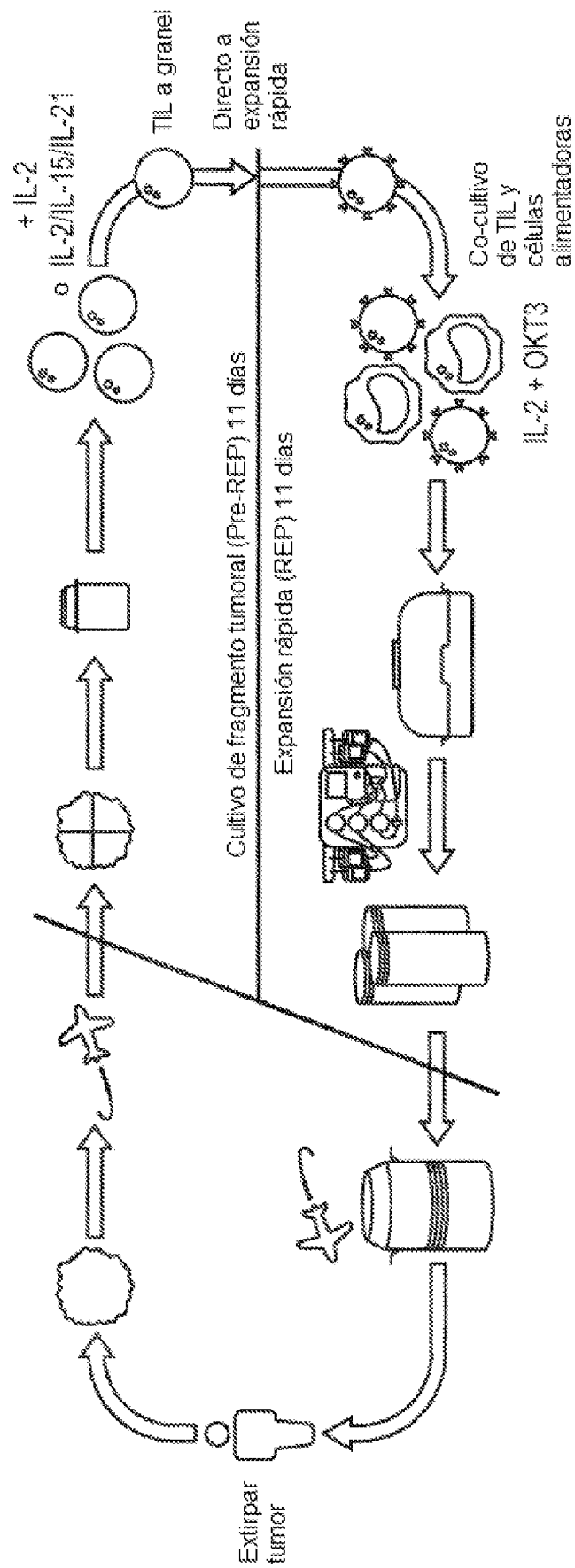


Figura 68

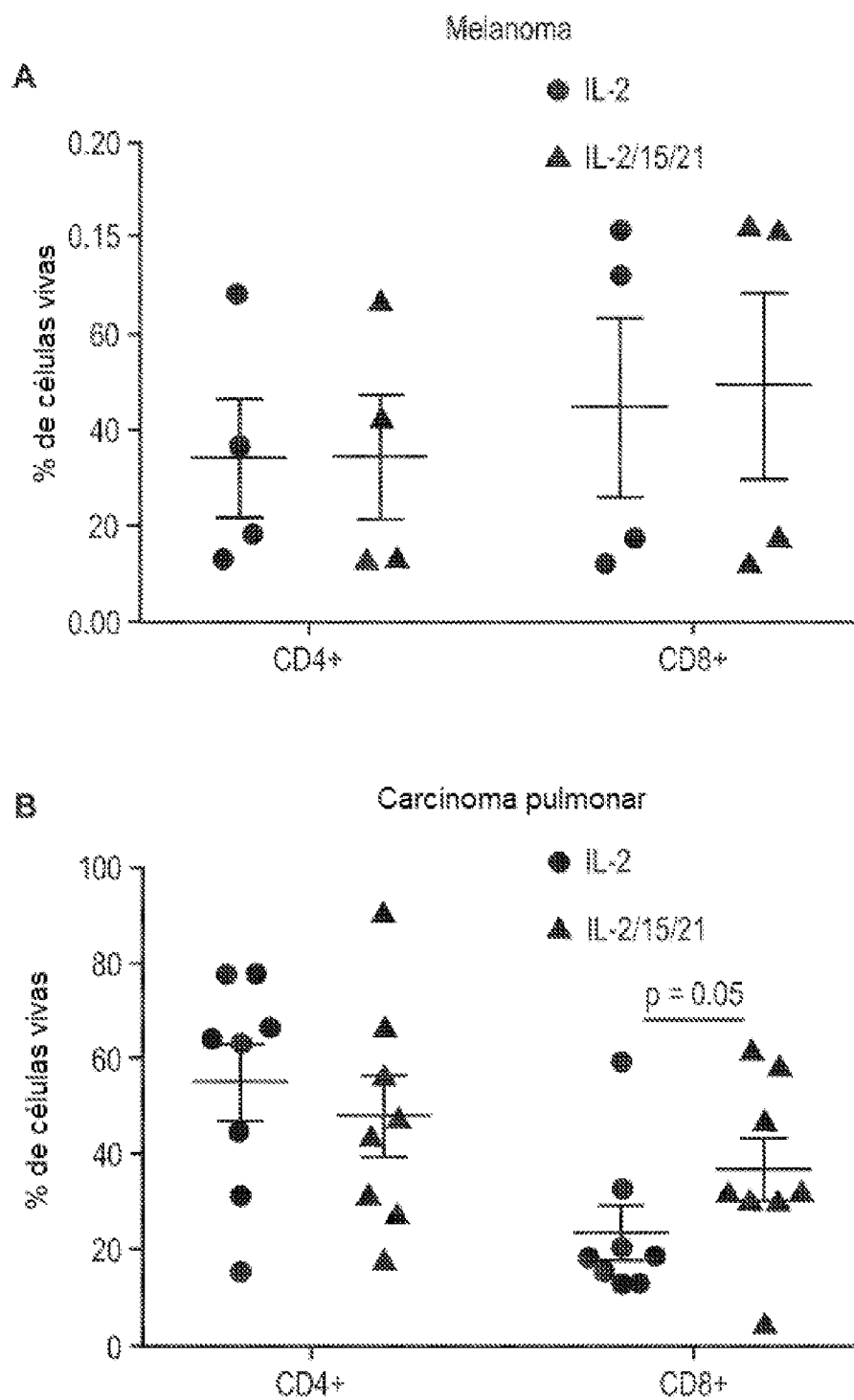


Figura 69

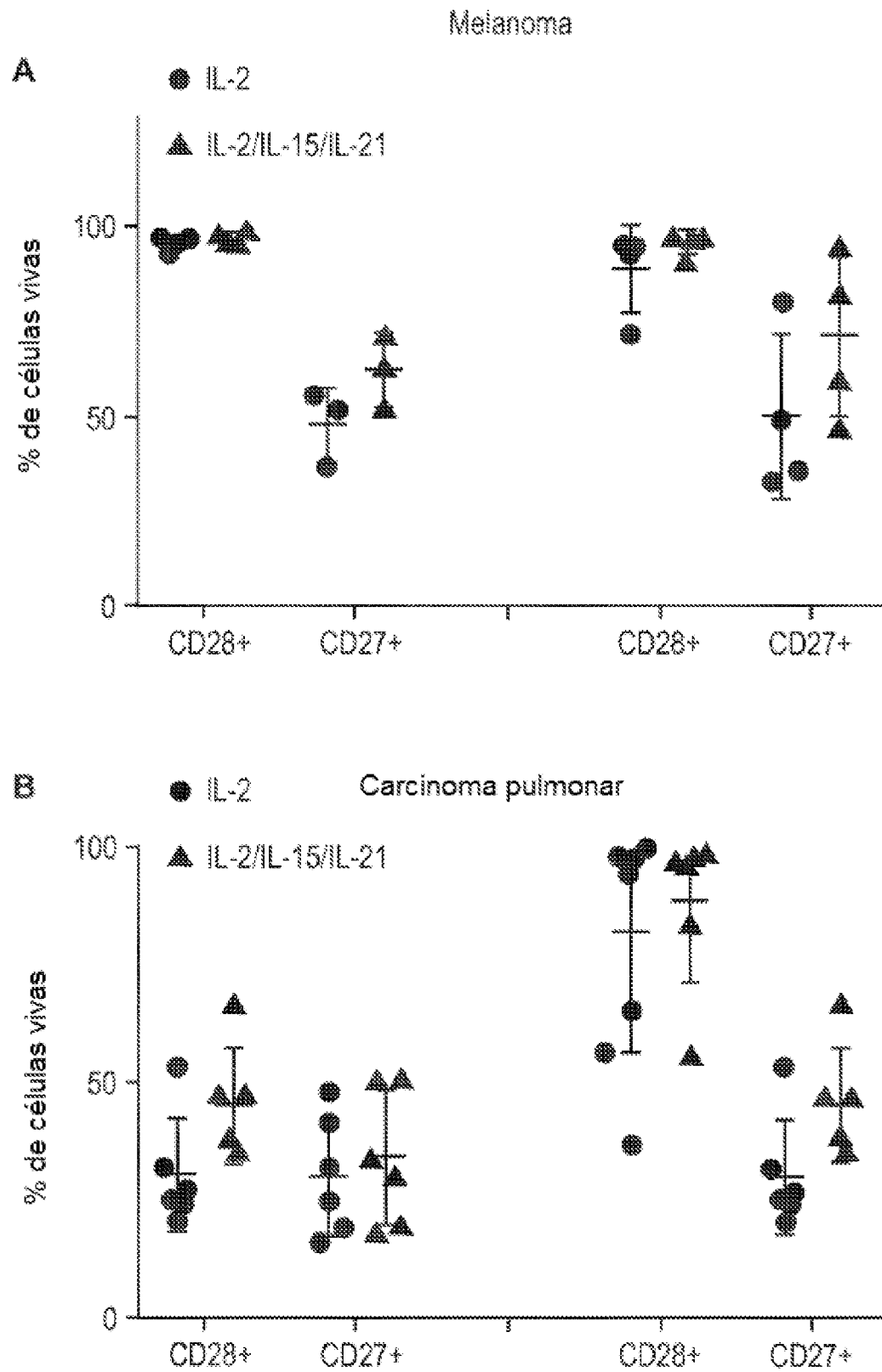


Figura 70

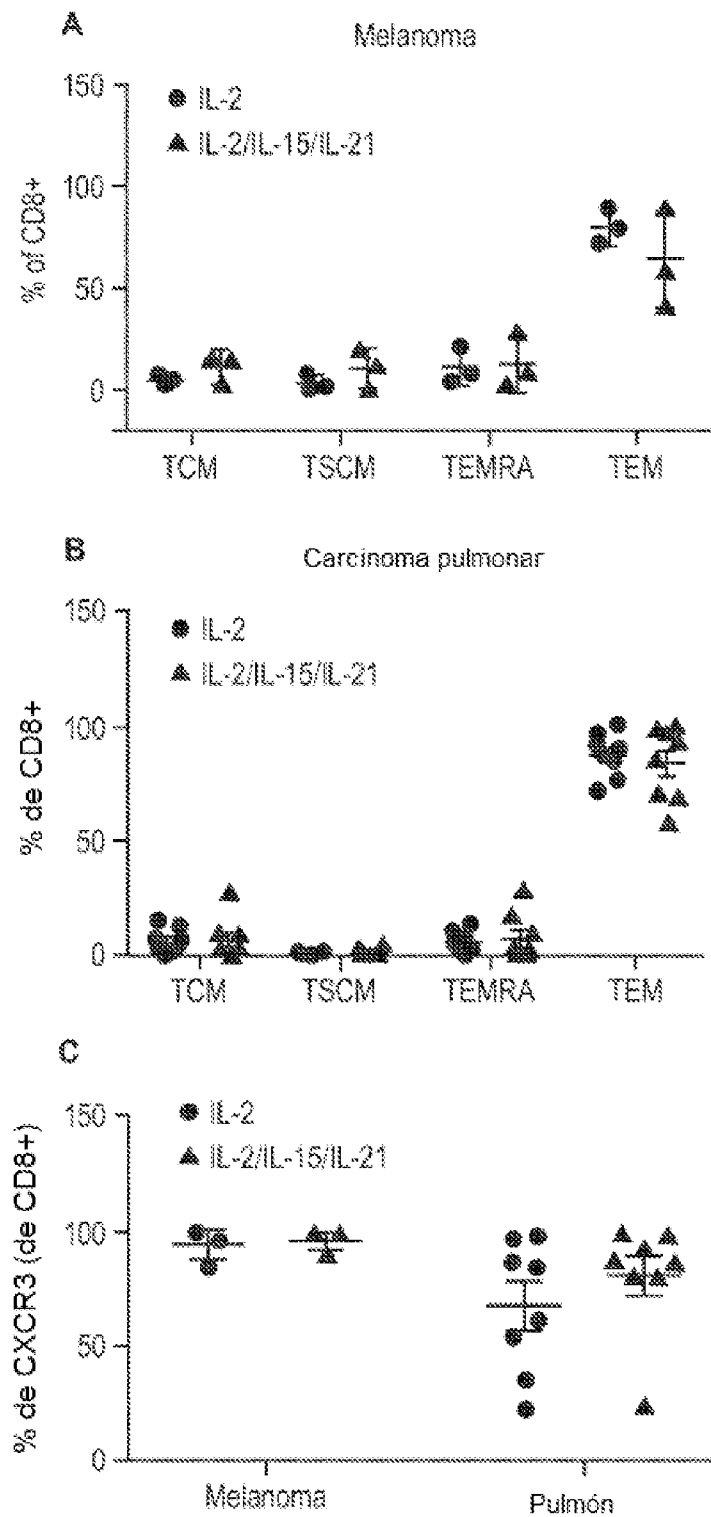


Figura 71

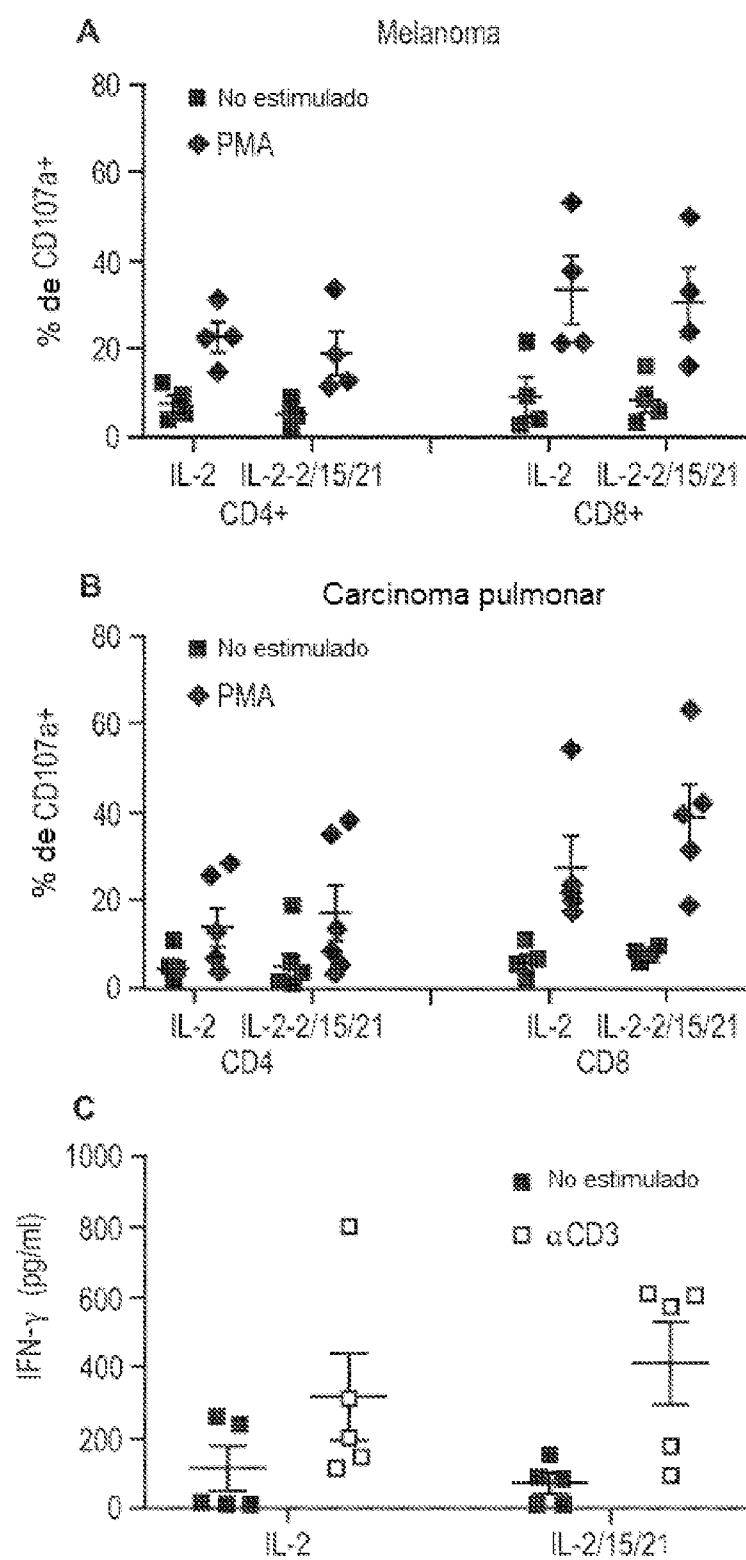


Figura 72

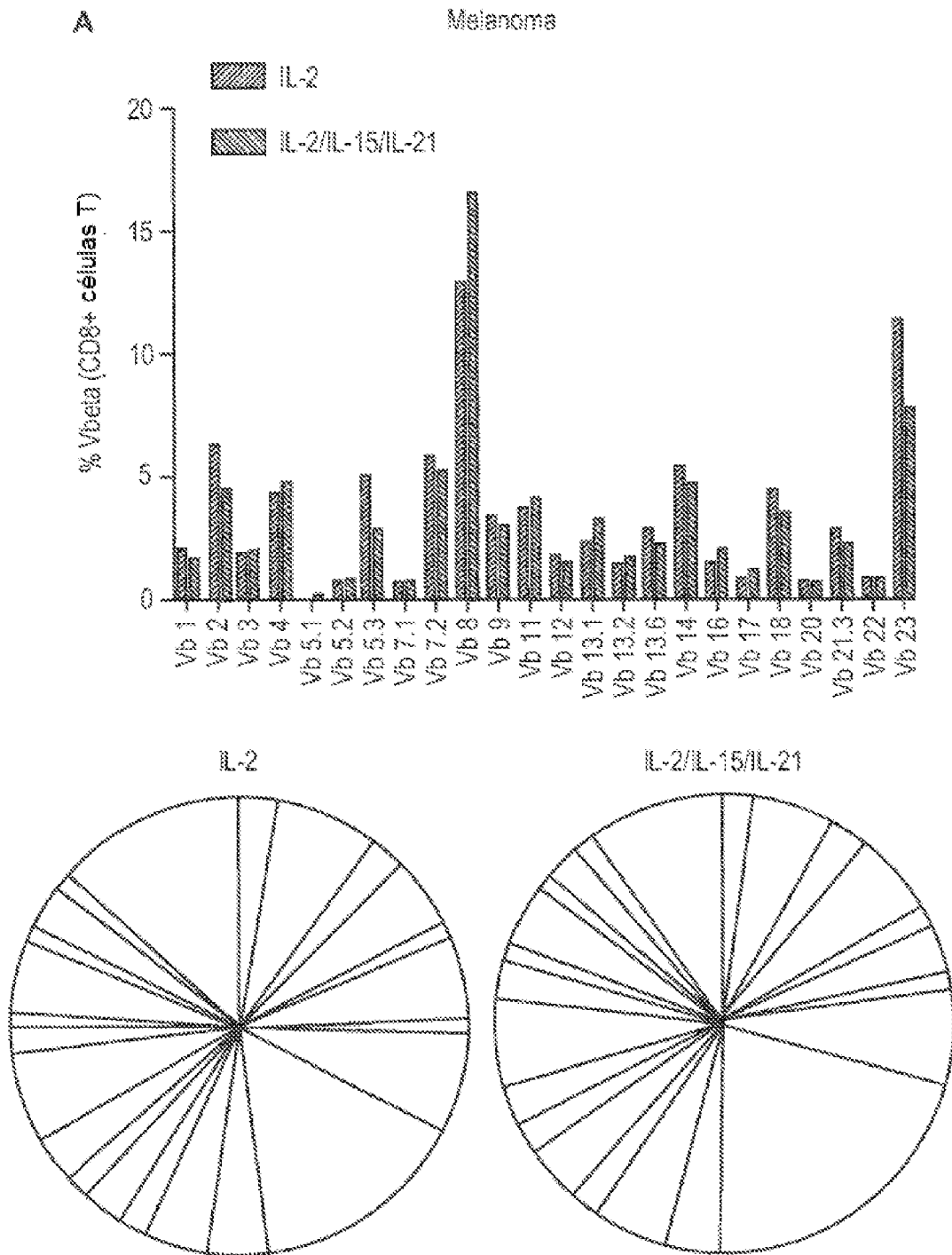


Figura 73A

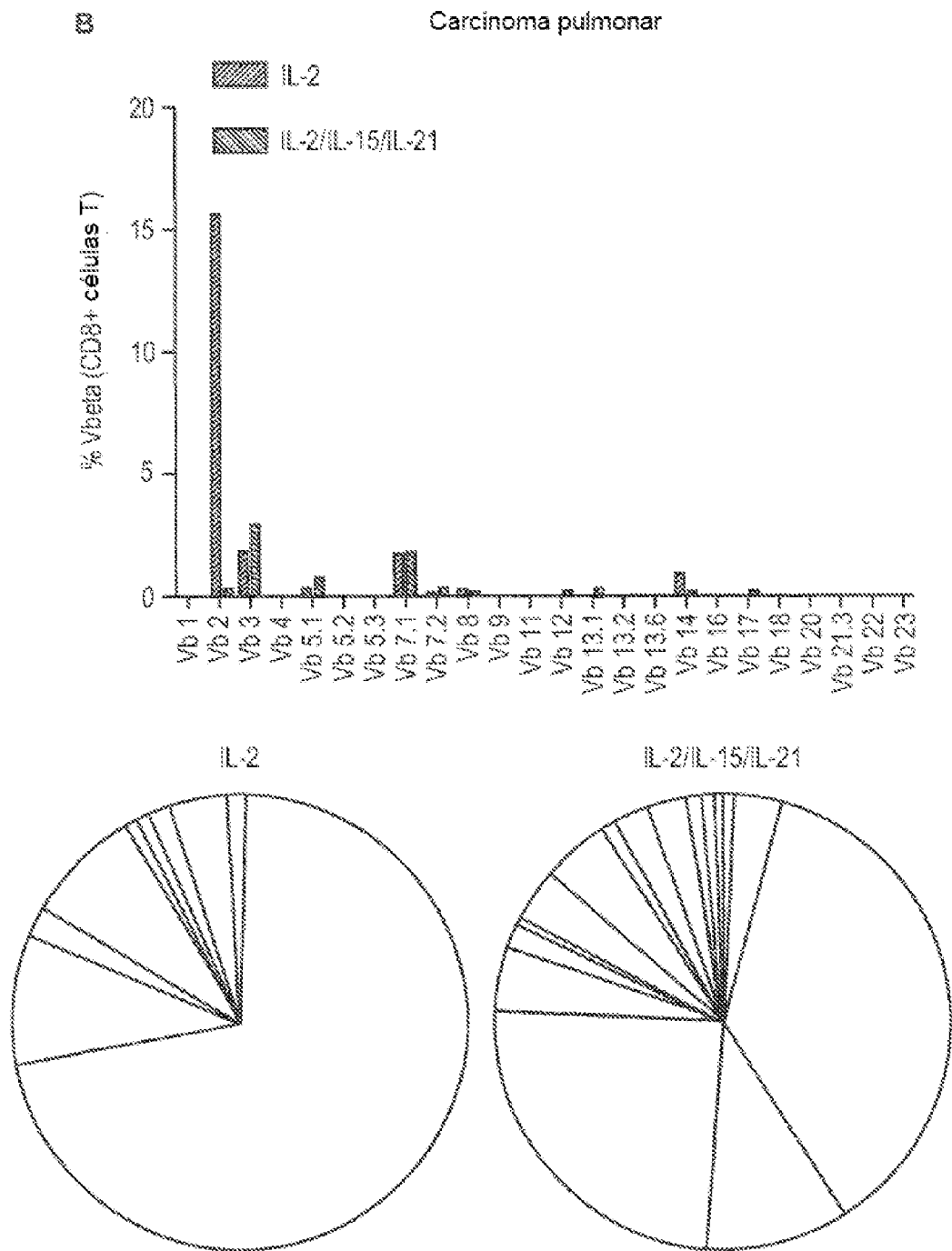


Figura 73B

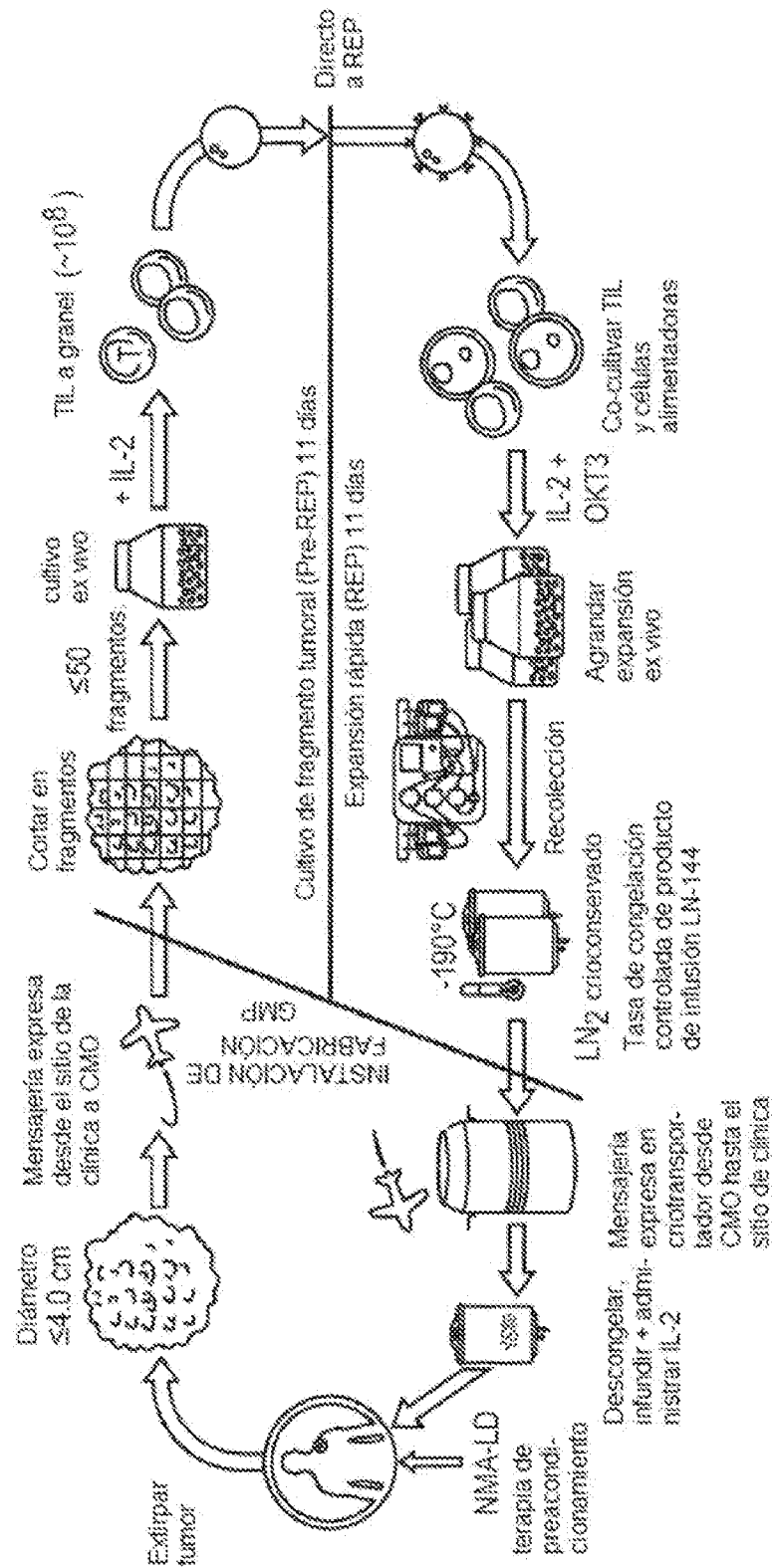


Figura 74

Figura 75

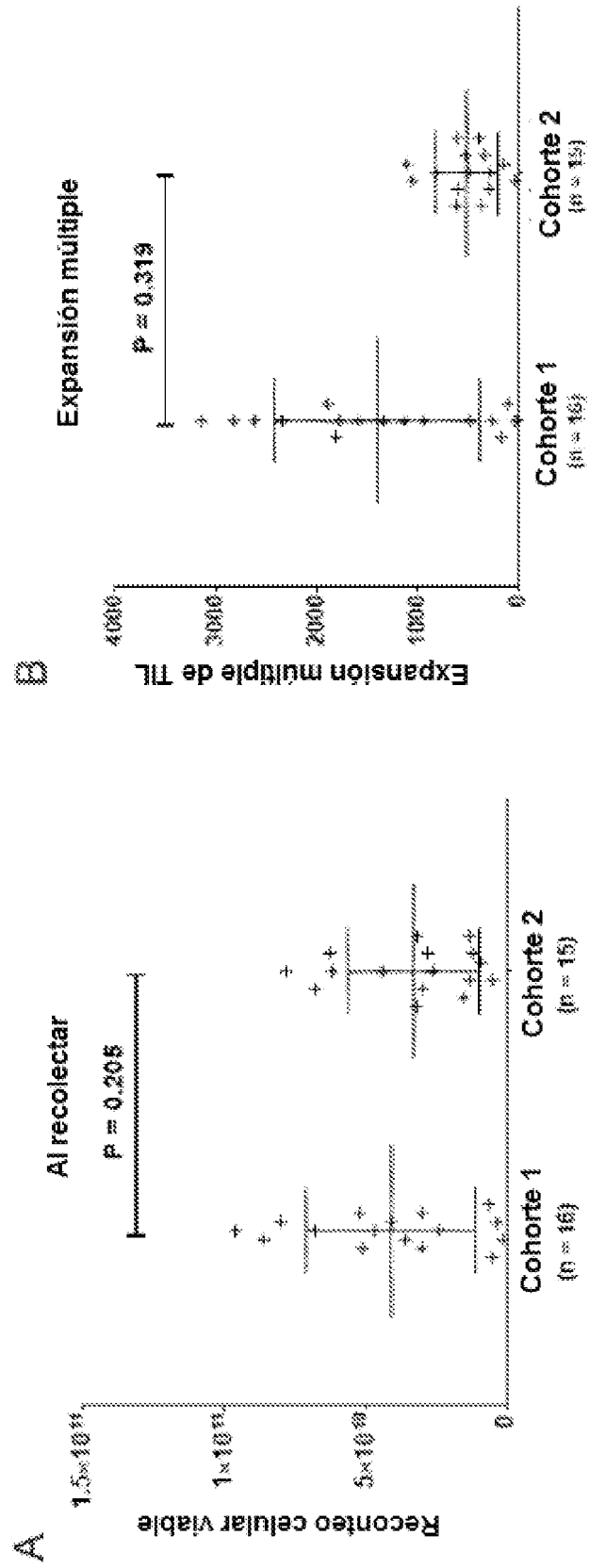


Figura 76

%CD45 CD3: Gen 1 vs. Gen 2

$p=0.3$ (ns)

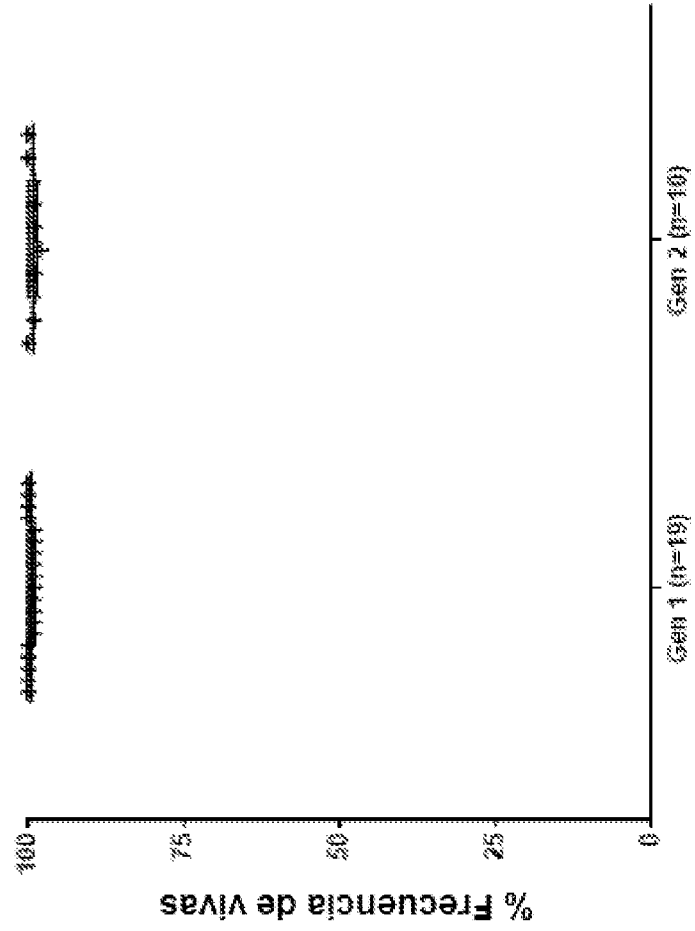


Figura 77

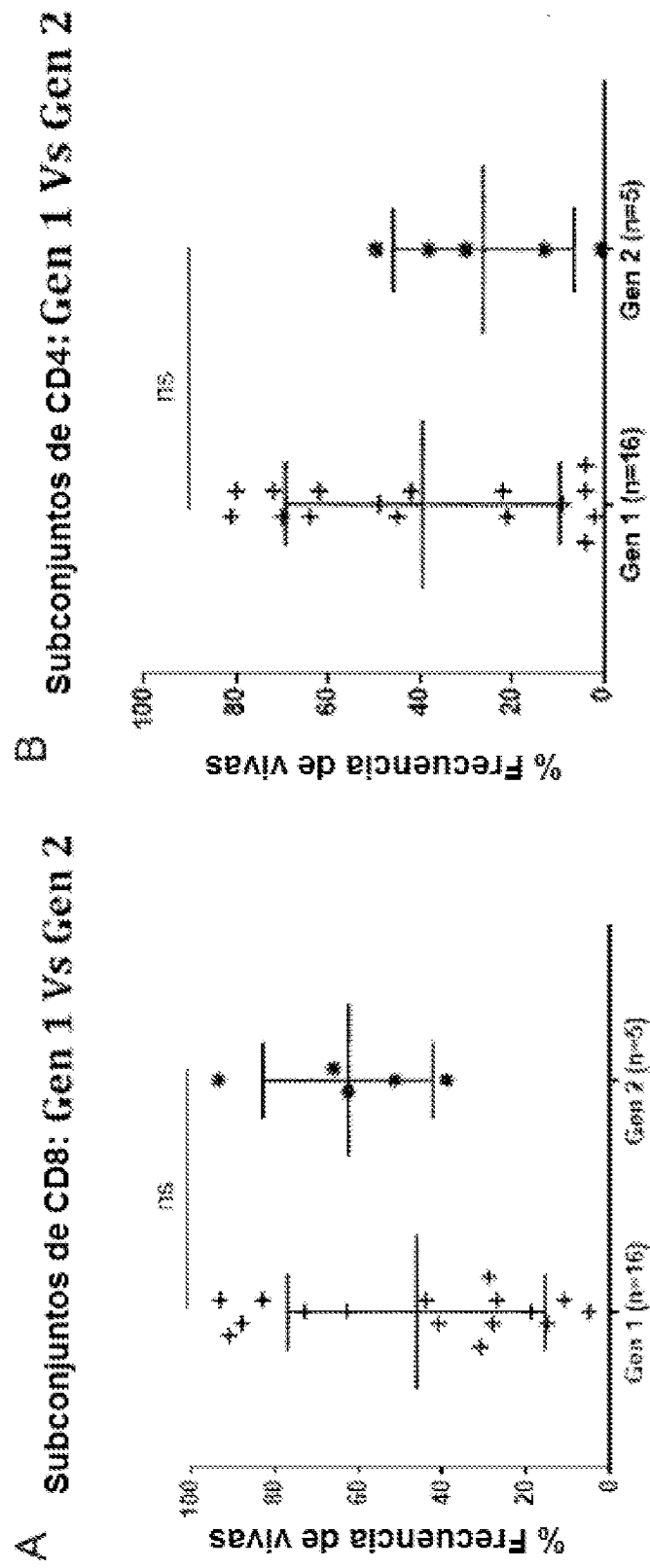


Figura 78

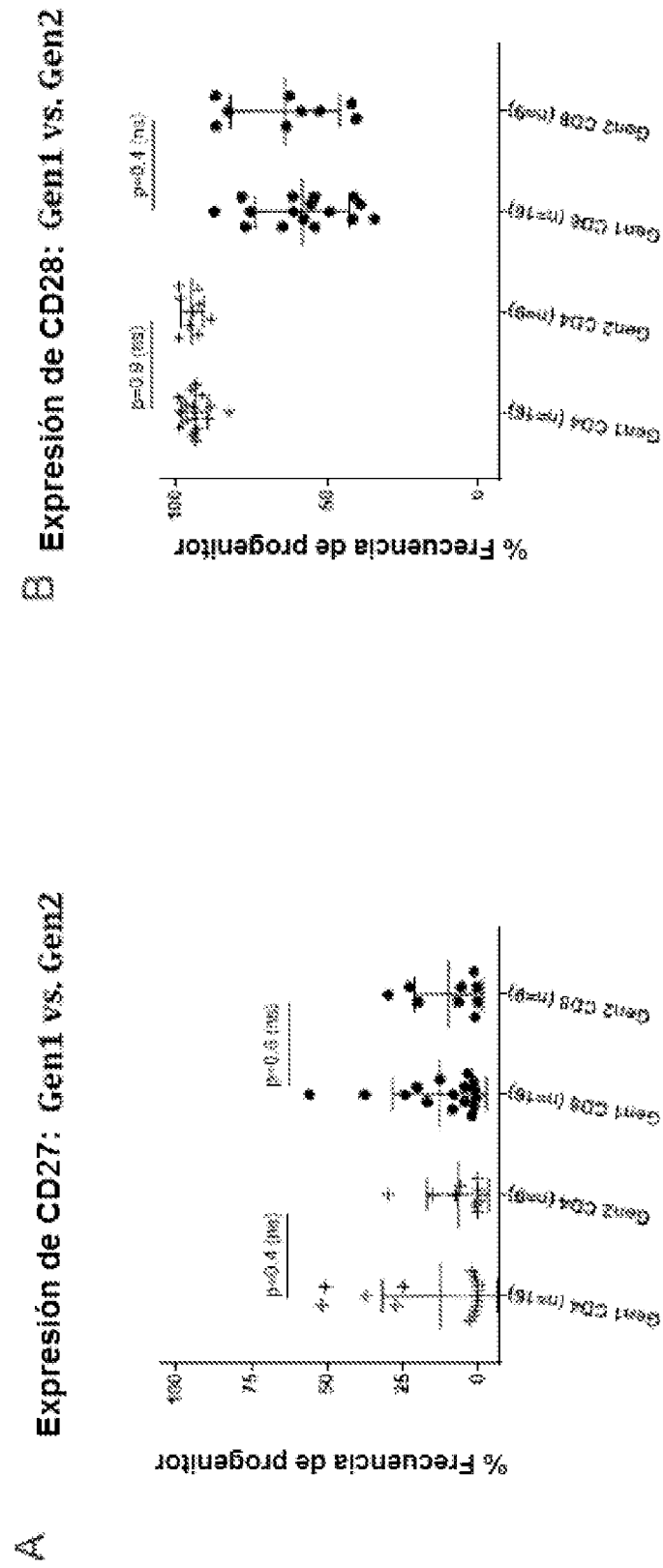


Figura 79

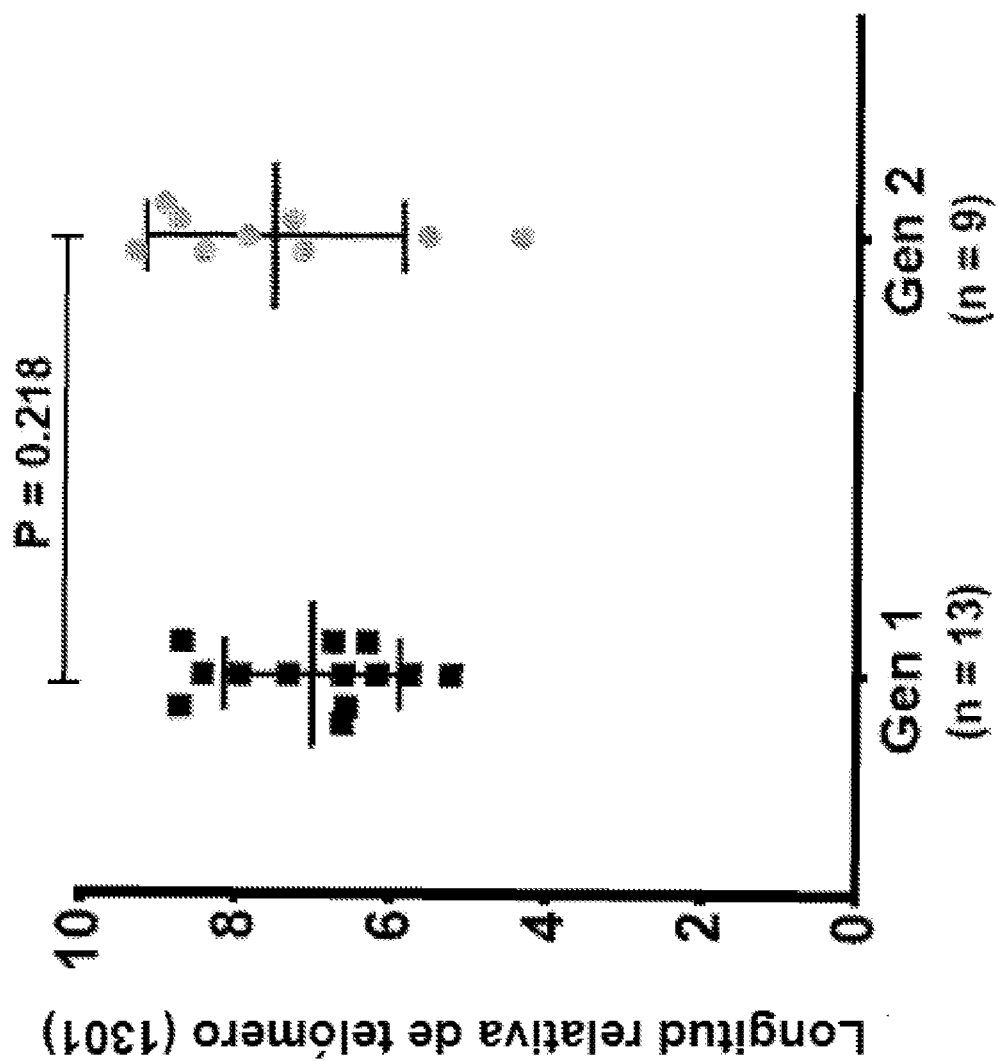


Figura 80

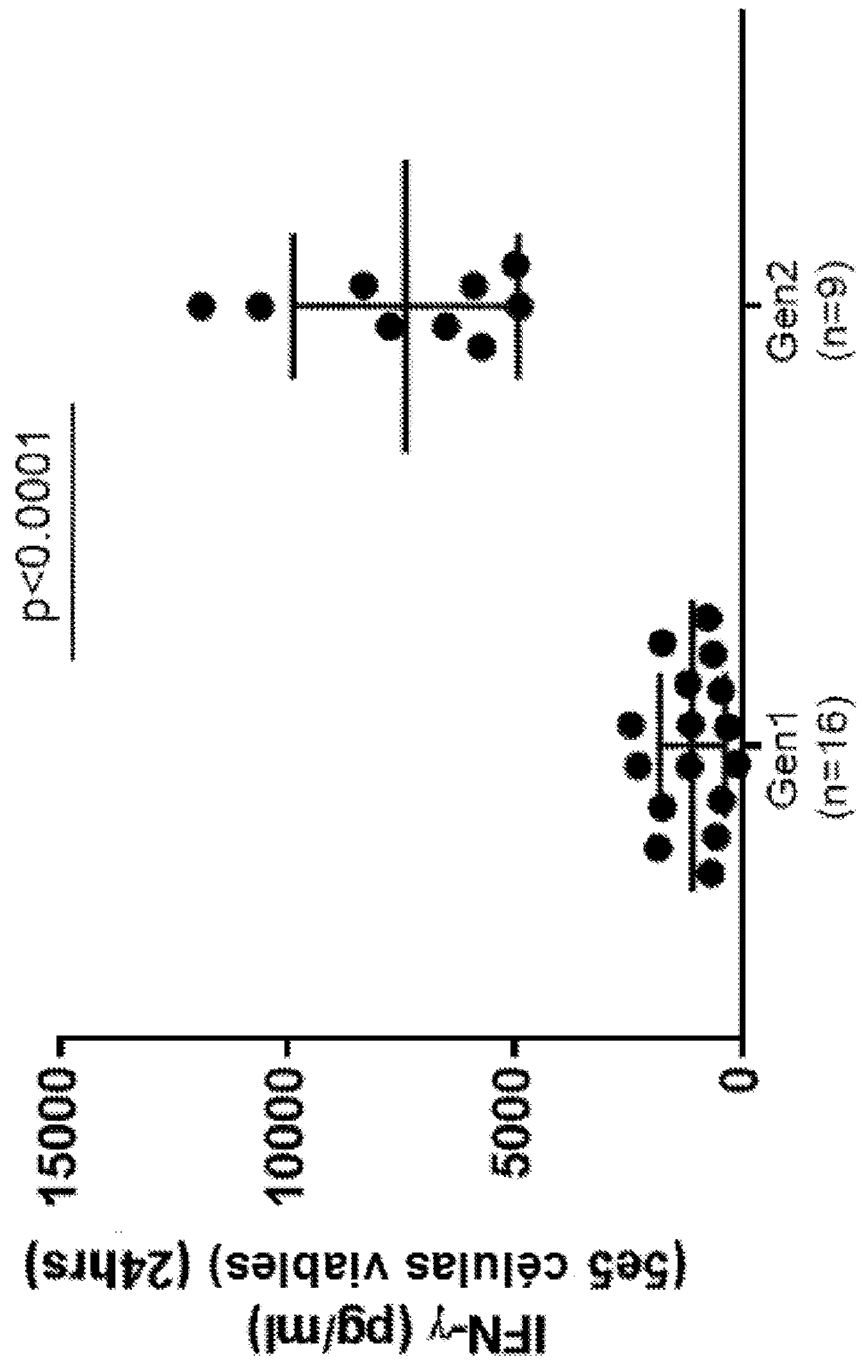
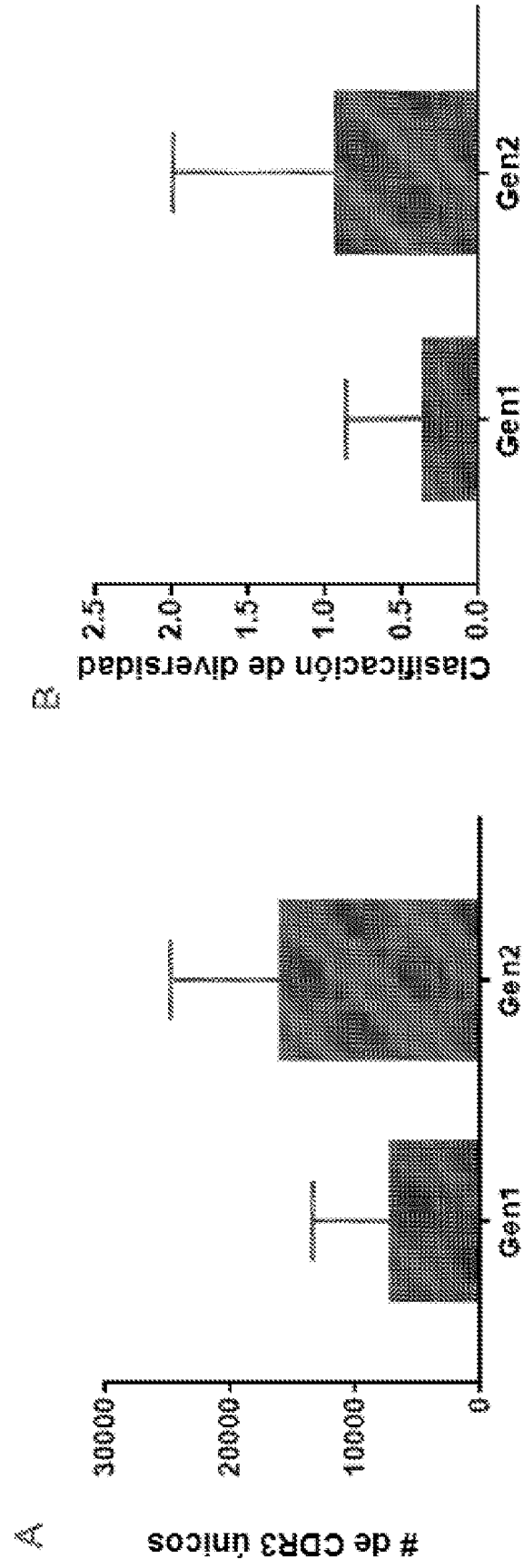


Figura 81



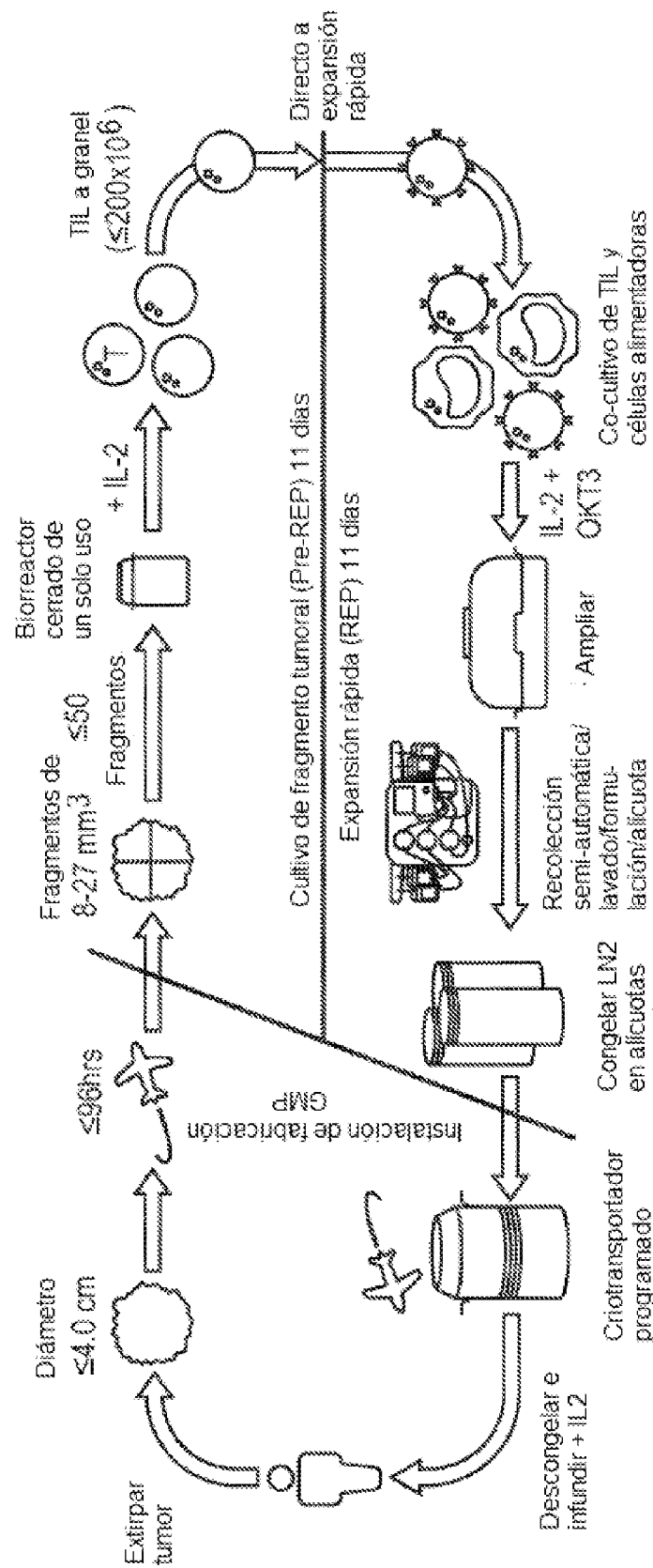


Figura 82

Figura 83

Proceso IC: 43-55 días para etapas A - E	Proceso 2A: cerca de 22 días desde etapas A - E
1. ETAPA A Obtener muestra tumoral de paciente	2. ETAPA A Obtener muestra tumoral de paciente
3. ETAPA B Fragmentación y primera expansión 11 días a 21 días	3. ETAPA B Fragmentación y primera expansión 3 días a 14 días
3. ETAPA C Primera expansión a segunda transición de expansión Almacenamiento opcional hasta selección	4. ETAPA C Primera expansión a segunda transición de expansión Sin almacenamiento y sistema cerrado
5. ETAPA D Segunda expansión IL-2, OKT-3, células alimentadoras que presentan antígeno Repetir opcionalmente una o más veces	5. ETAPA D Segunda expansión IL-2, OKT-3 y células alimentadoras que presentan antígeno Sistema cerrado
6. ETAPA E Recolectar TIL de la etapa D	7. ETAPA E Recolectar TIL de la etapa D Sistema cerrado
6. ETAPA F Formulación final y/o transferencia a bolsa de infusión	8. ETAPA F Formulación final y/o transferencia a bolsa de infusión (opcionalmente criopreservar)

Figura 84

Etapa de proceso	Realización 1C del proceso	Realización 2A del proceso	Ventajas
Pre-REP	4 fragmentos por 10 matraces GREX-10 11-21 días de duración	40 fragmentos por 1 matraz GREX-100M 11 días de duración	- Fragmentos tumorales aumentados por matraz - Tiempo de cultivo abreviado - Número reducido de etapas - Dispuesto a sistema cerrado
Transición pre-REP a REP	- Los TIL pre-REP se congelan hasta fenotiparse para selección, luego se descongelan para proceder a REP (~ día 30) - REP requiere $>40 \times 10^6$ TIL	- Mover TIL pre-REP directamente a REP el día 11 - REP requiere 25-200 $\times 10^6$ TIL	- Proceso pre-REP-a-REP abreviado - Número reducido de etapas - Selección de fenotipado eliminada - Dispuesto a sistema cerrado
REP	6 matraces GREX-100M en REP día 0 5×10^6 TIL y 5×10^6 PBMC alimentadores por matraz en REP día 0 - Separar en 18-36 matraces en REP día 7 14 días de duración	1 matraz GREX-500M el día 11 25-200 $\times 10^6$ TIL y 5×10^6 PBMC alimentadores el día 11 - Separar en ≤ 6 GREX-500M matraces el día 16 11 días de duración	- Número reducido de etapas - Duración abreviada de REP - Transferencia de sistema cerrado de TIL entre matraces - Intercambios de medios de sistema cerrado
Recolección	TIL recolectado mediante centrifugación	TIL recolectado por medio del sistema LOVO automatizado de lavado de células	- Número reducido de etapas - Lavado de células automatizado - Sistema cerrado - Pérdida reducida de producto durante lavado
Formulación final	- Producto fresco en hipotermosol - Bolsa de infusión individual - Estabilidad de envío limitada	- Producto criopreservado en PlasmaLyte-A + 1% HSA y CS10 almacenado en LN₂ - Alícuotas múltiples - Mayor estabilidad de envío	- Flexibilidad de envío - Programación flexible de paciente - Pruebas de liberación más oportunas
Tiempo de proceso estimado total	43-55 días	22 días	Tiempo de entrega más rápido al paciente

Figura 85



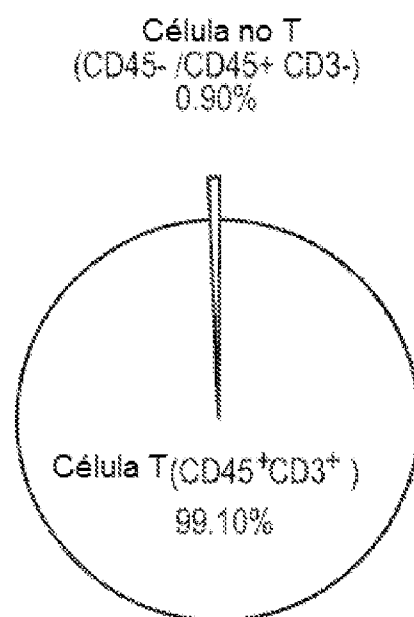


Figura 86A

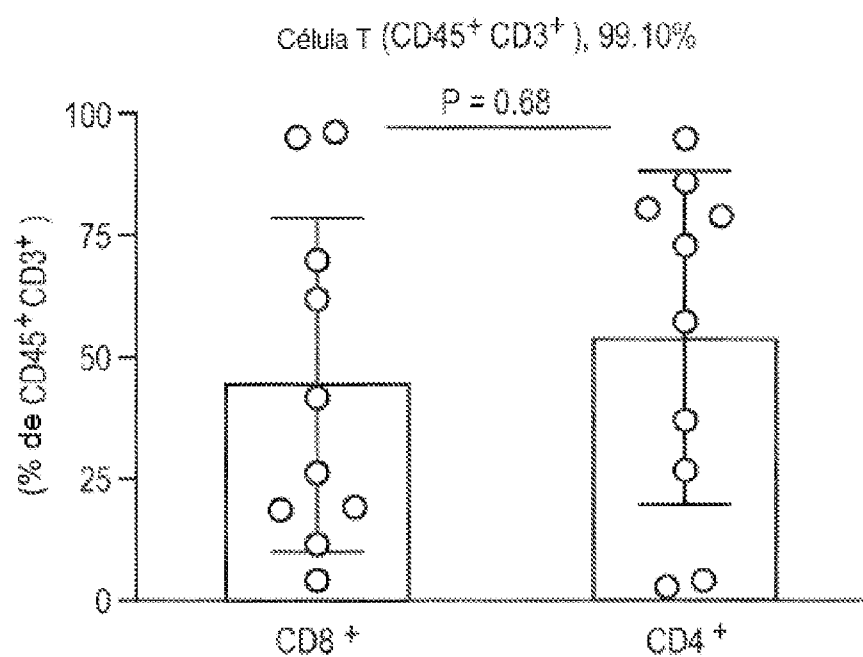


Figura 86B

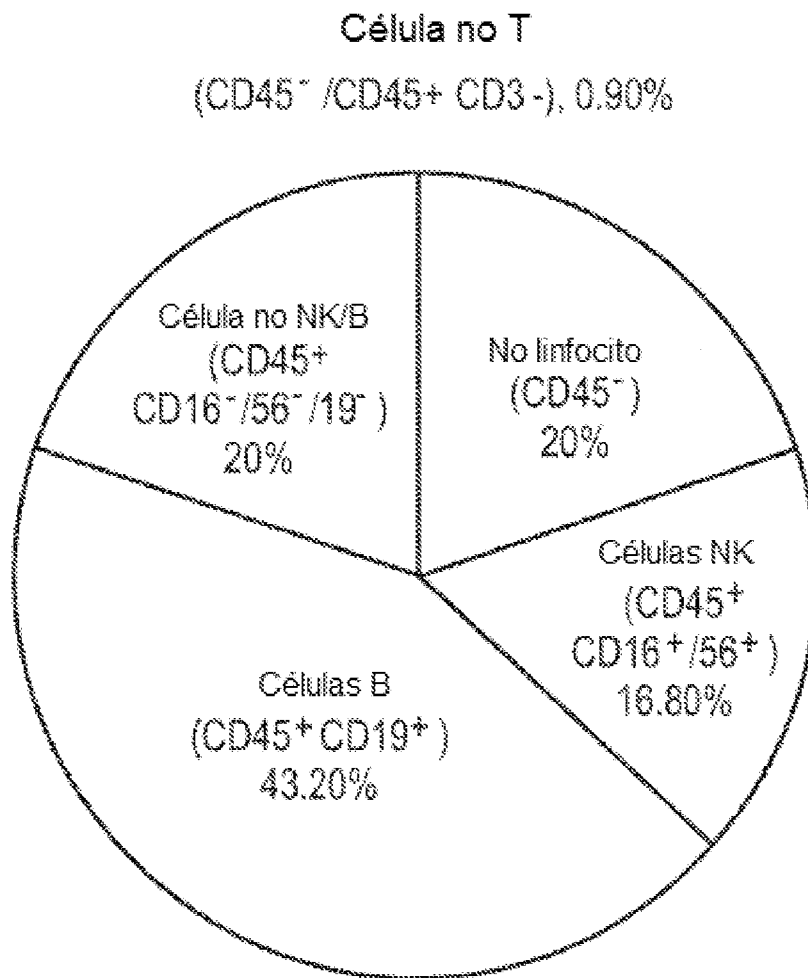


Figura 86C

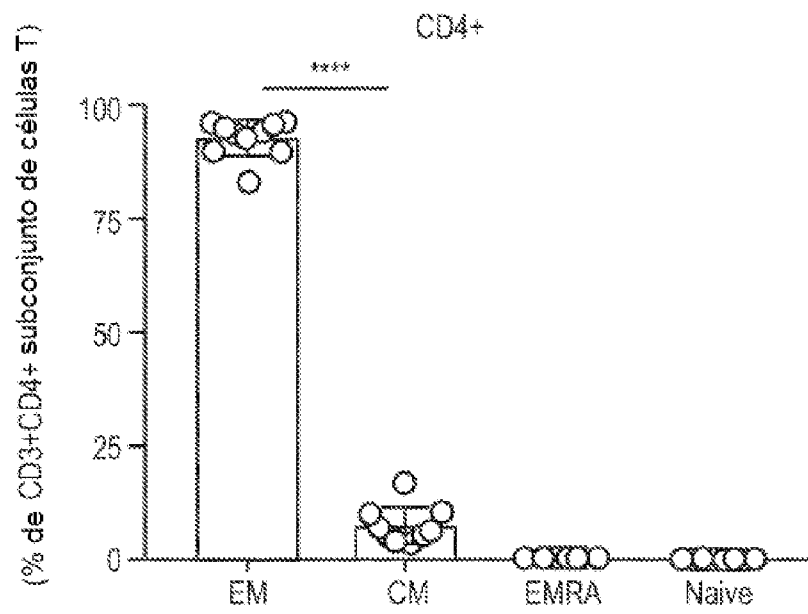


Figura 87A

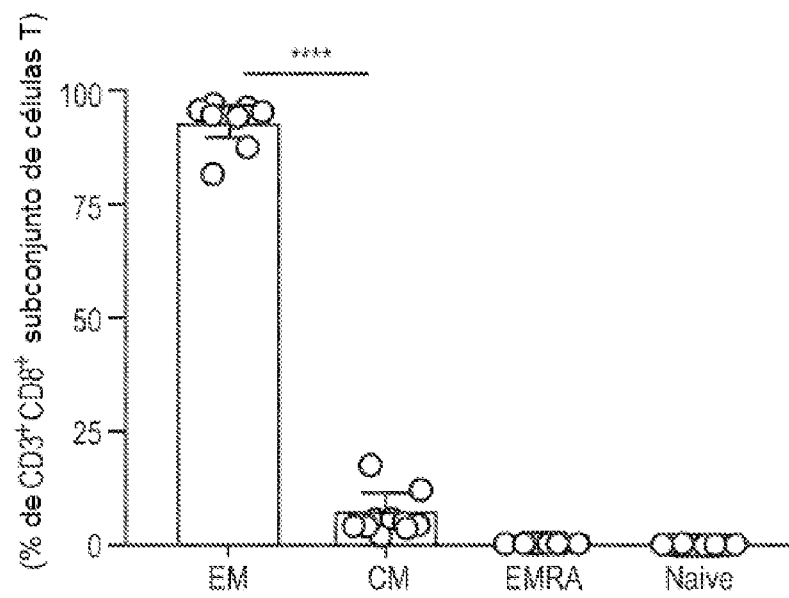


Figura 87B

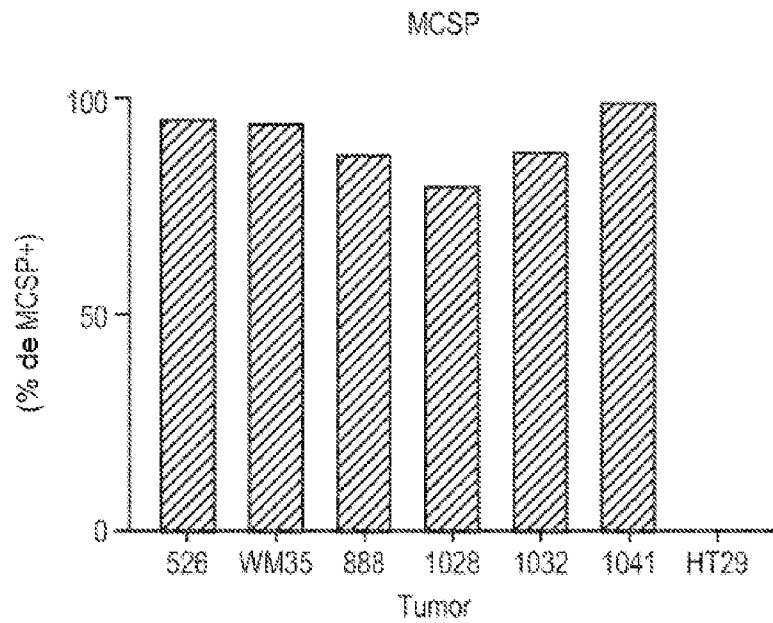


Figura 88A

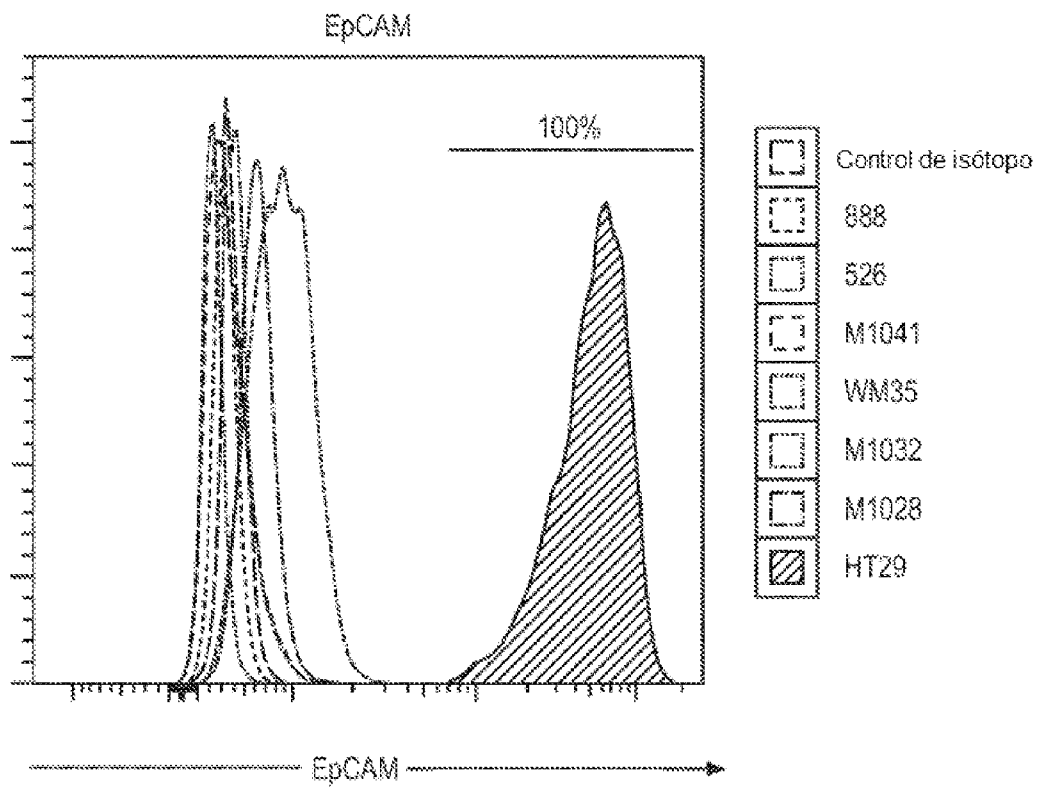


Figura 88B

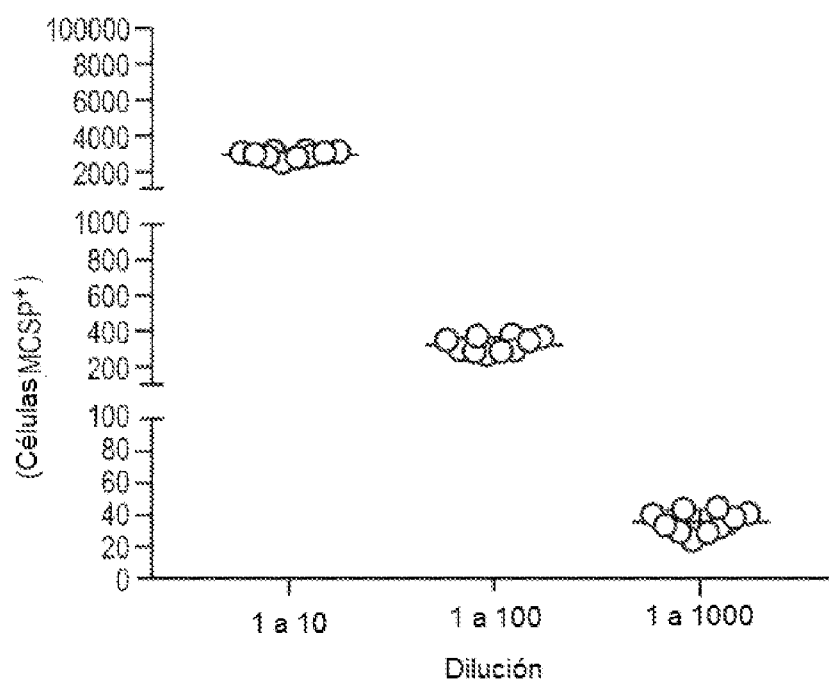


Figura 89A

DILUCIÓN	AV	SD	LÍMITE SUPERIOR (AV + 3SD)	LÍMITE INFERIOR (AV - 3SD)
1 a 10	2976	203	3585	2367
1 a 100	322	39	440	204
1 a 1000	36	7	56	16

Figura 89B

DILUCIÓN	RANGO (SUPERIOR- INFERIOR)	EXP#1 (AV)	EXP#2 (AV)	EXP#3 (AV)
1 a 10	3585-2367	2814	3282	2367
1 a 100	440-204	227	320	239
1 a 1000	56-16	27	25	32

Figura 90A

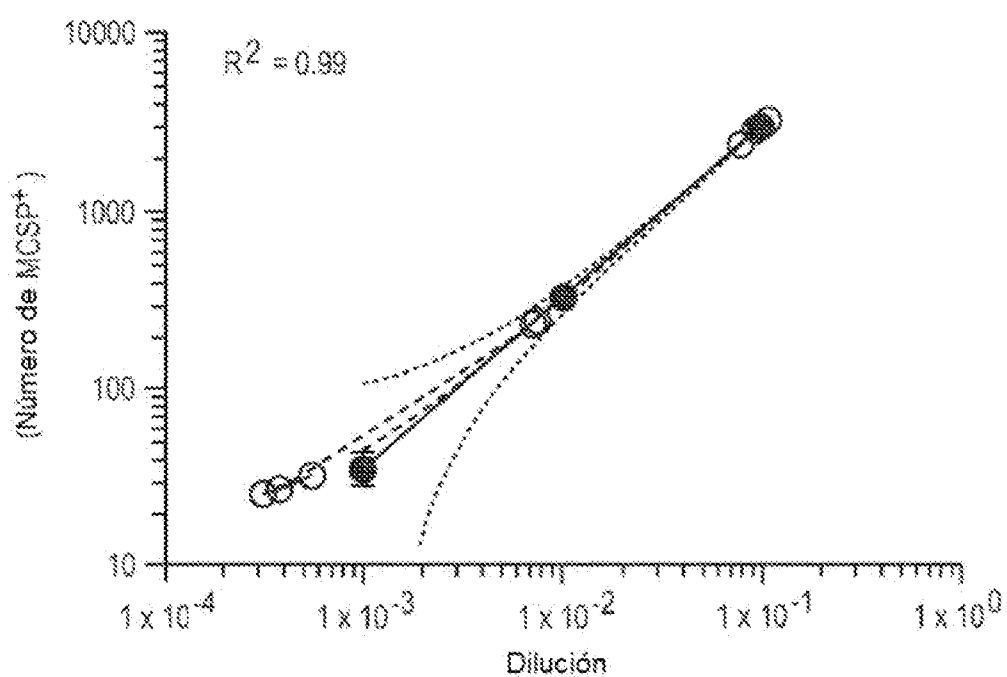
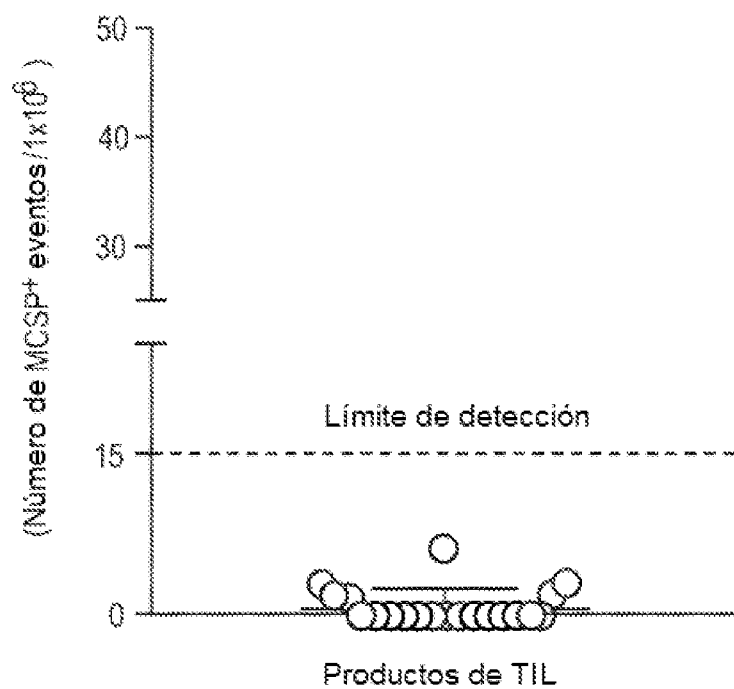


Figura 90B



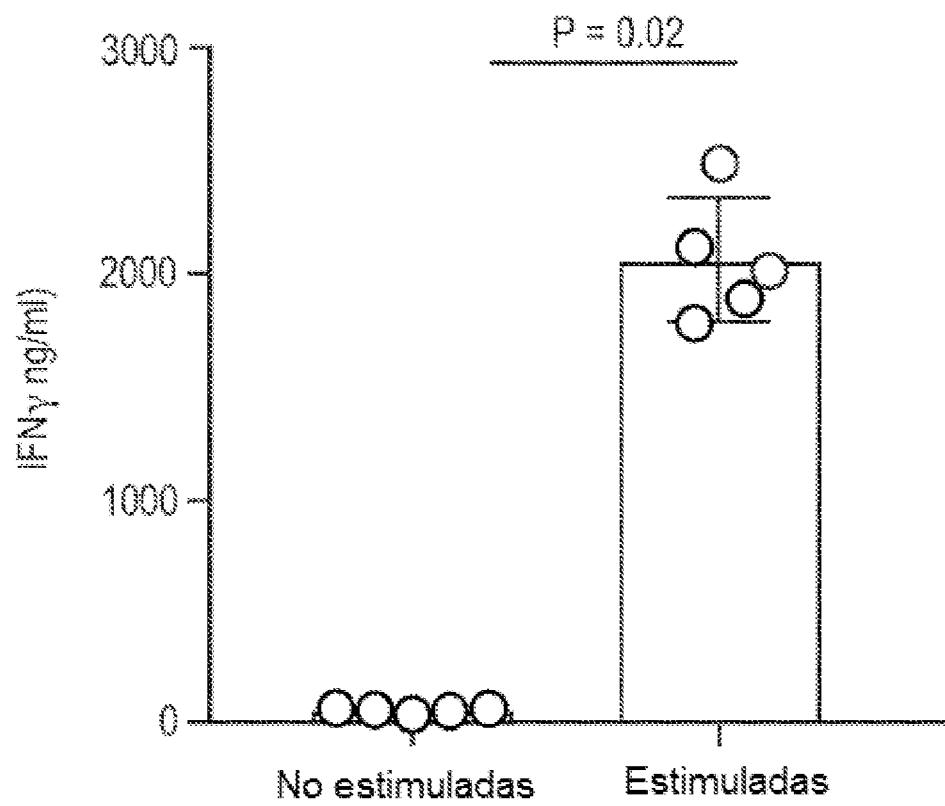


Figura 92

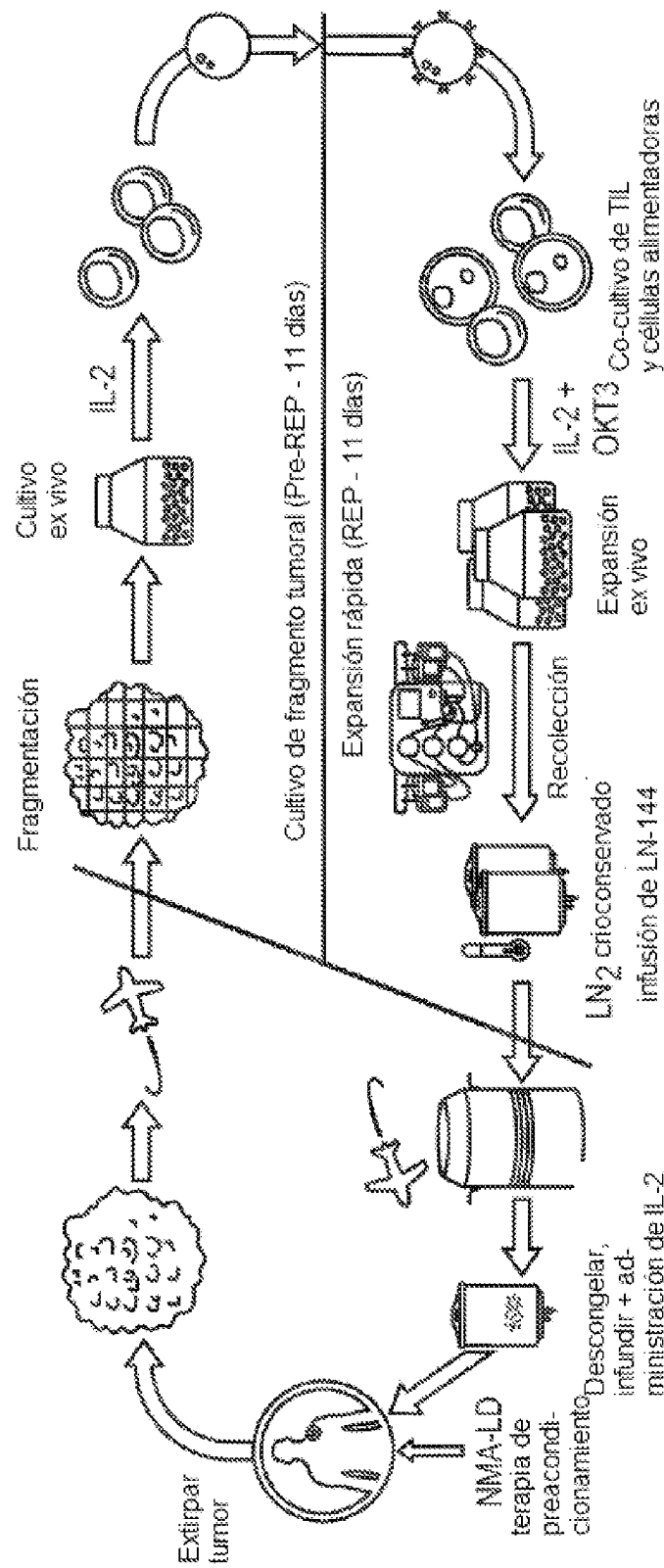


Figura 93

Figura 94

Etapa de proceso	GEN 1	GEN 2	IMPACTO
Cultivo de fragmento	≤ 21 días, biorreactores múltiples, intervenciones múltiples de operador	≤ 11 días, biorreactor cerrado individual, sin intervención	Abrevia cultivo, reduce intervenciones
Selección de TIL	TIL expandido de IL-2, crioconservado, probado, selección basada en fenotipo, descongelamiento, reposo co-cultivo	TIL a granel directo a co-cultivo	Reduce etapas, elimina pruebas, aumenta diversidad clonal
Recolección/lavado	Reducción de volumen manual y recolección. Lavado manual y concentración	Reducción de volumen semi-automatizado cerrado y recolección. Lavado automatizado y concentración	Reduce intervenciones de operador, reduce tiempo de tratamiento, mantiene sistema funcionalmente cerrado
Formulación	Producto fresco hipotérmico (2 - 8°C)	Producto crioconservado (≤ -150°C)	Permite ensayos globales mediante flexibilidad aumentada en el envío y programación del paciente
Tiempo de fabricación	Día 38 de tiempo de proceso	Día 22 de tiempo de proceso	Tiempo de entrega al paciente, rendimiento de espacio limpio, bajo coste de bienes

Figura 95A

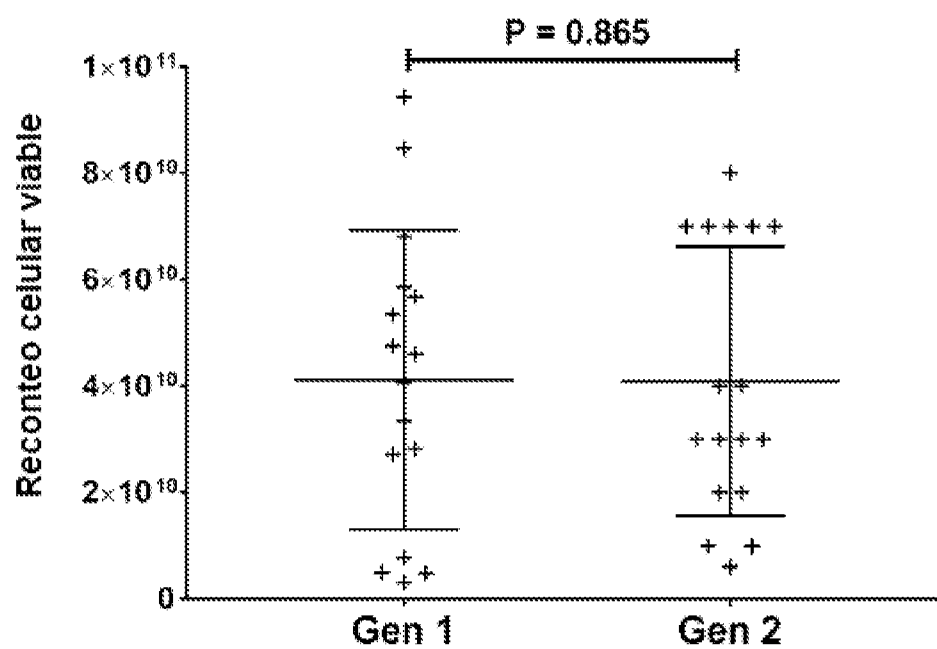


Figura 95B

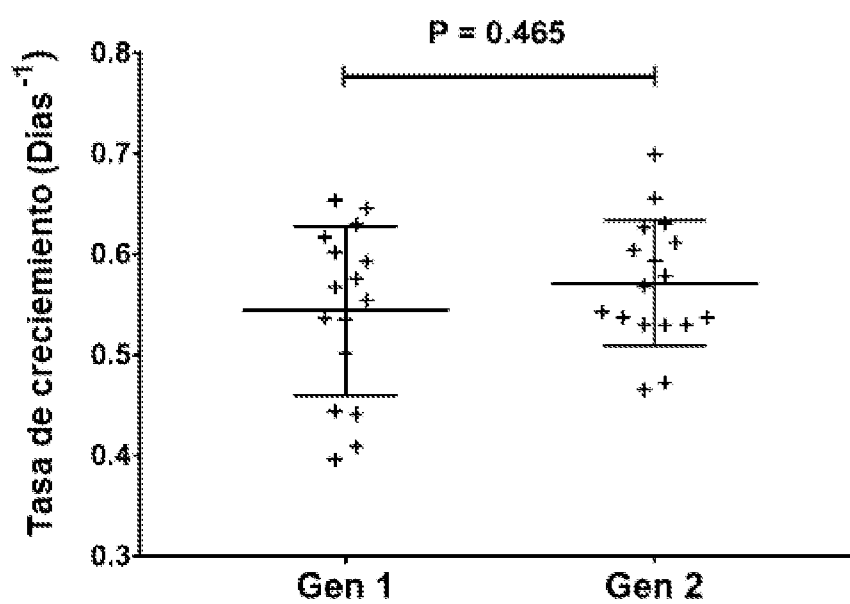


Figura 95C

Viabilidad

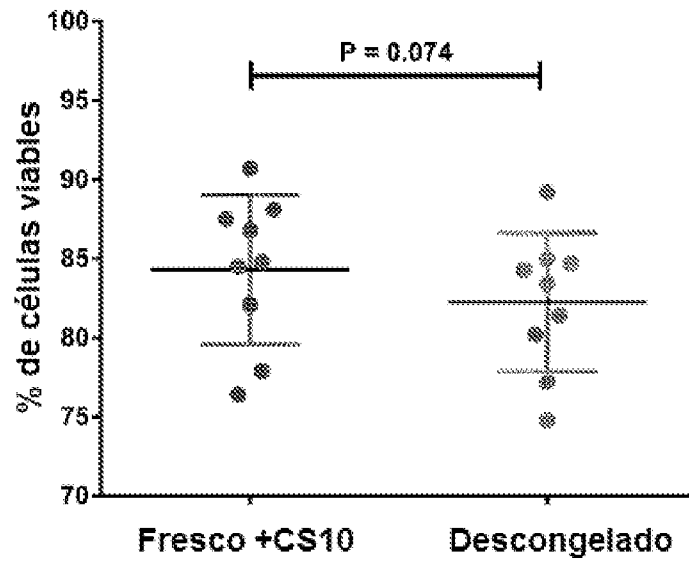


Figura 96A

%CD45 CD3: Gen 1 vs. Gen 2

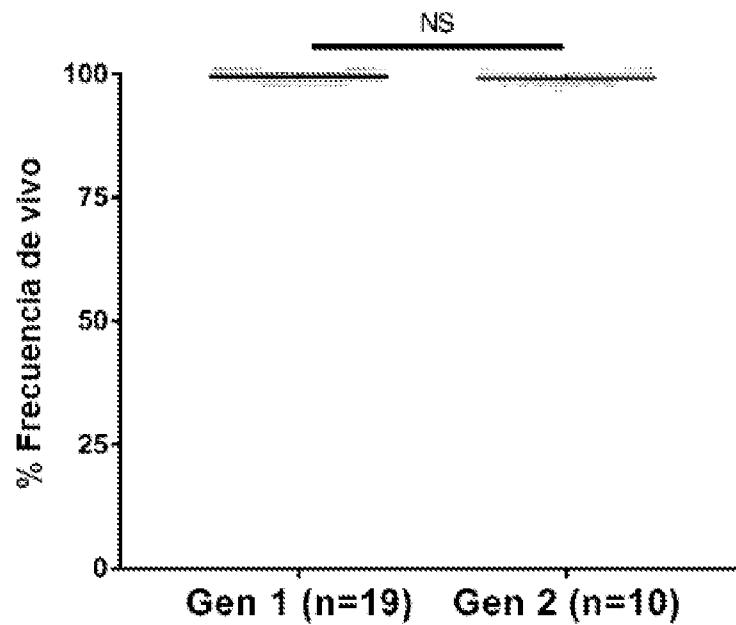


Figura 96 B

Expresión de CD27 : Gen1 vs. Gen2

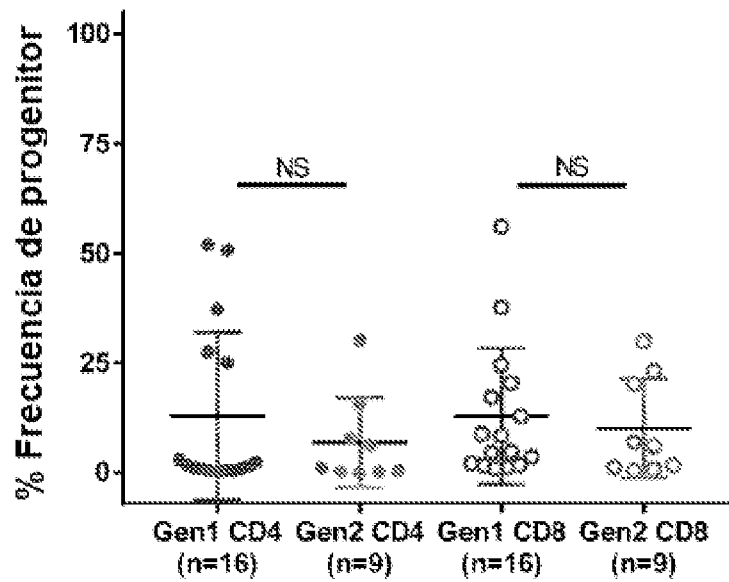


Figura 96C

Expresión de CD28 : Gen1 vs. Gen2

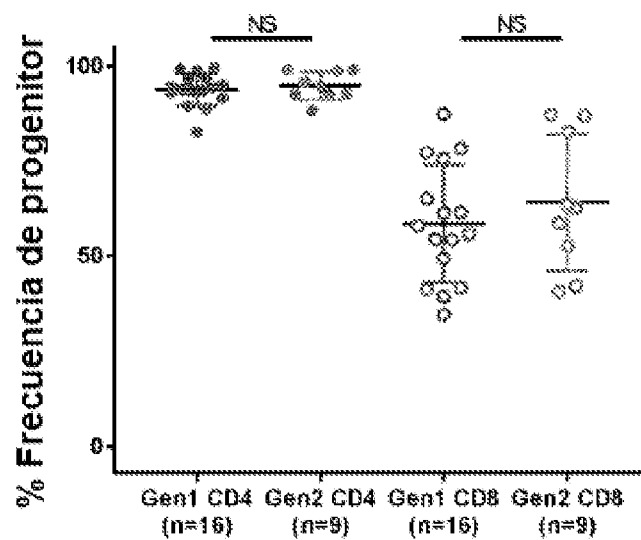


Figura 97

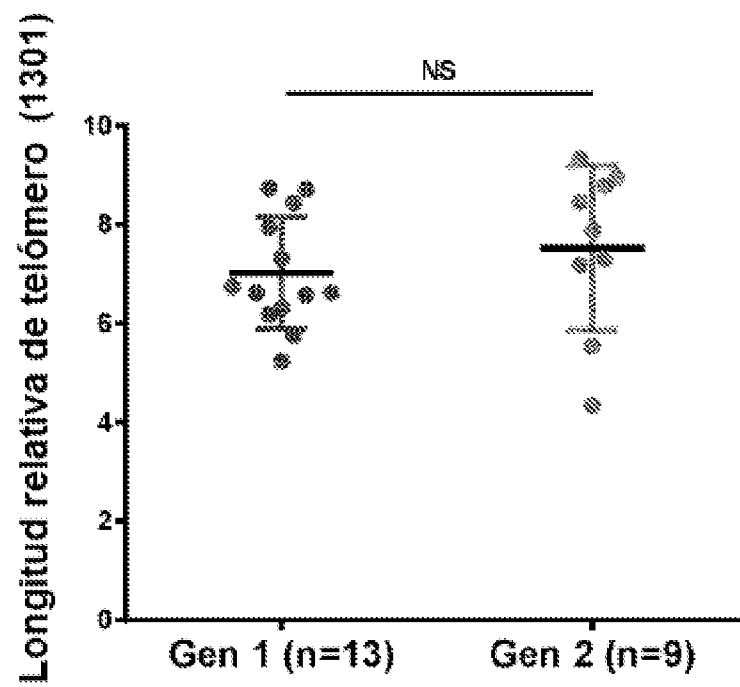


Figura 98

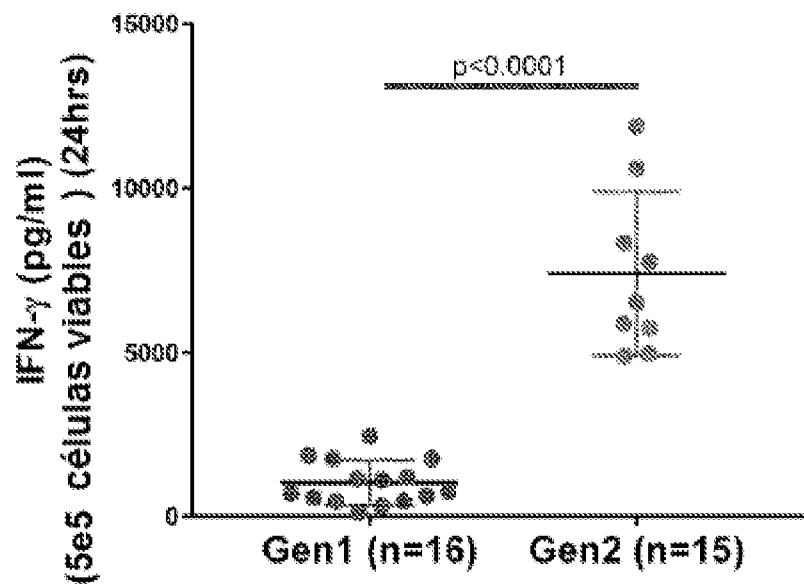


Figura 99A

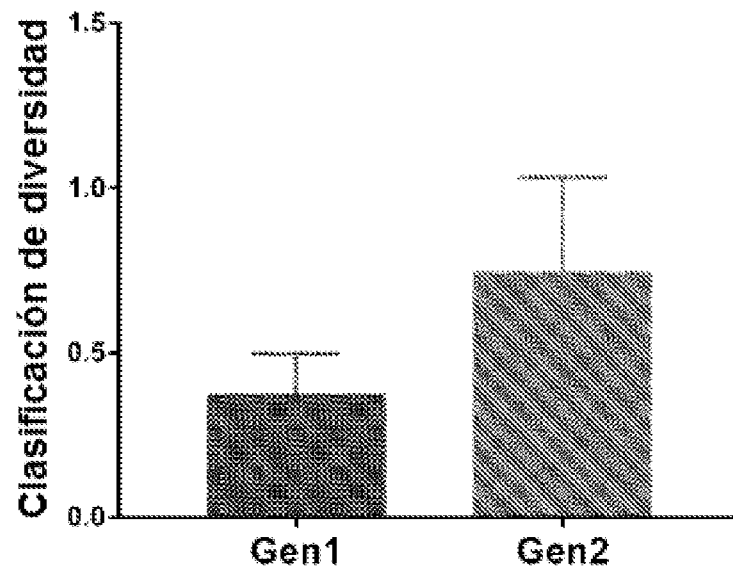


Figura 99B

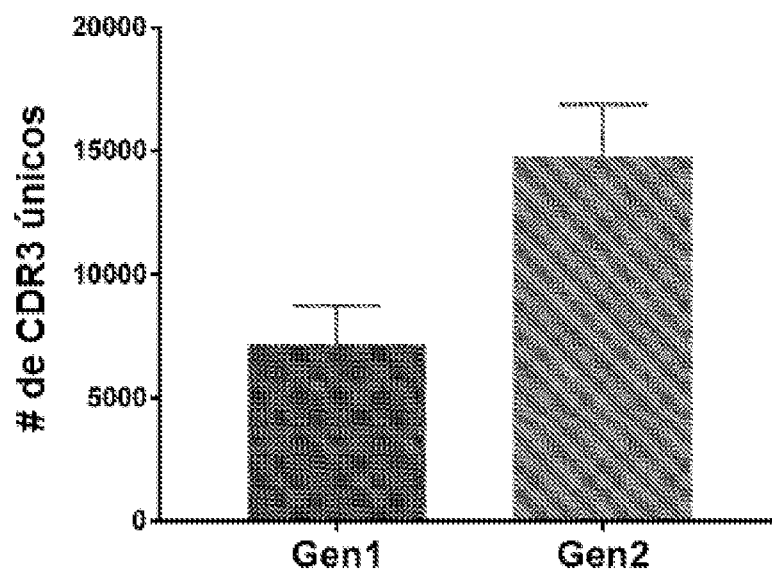


Figura 100

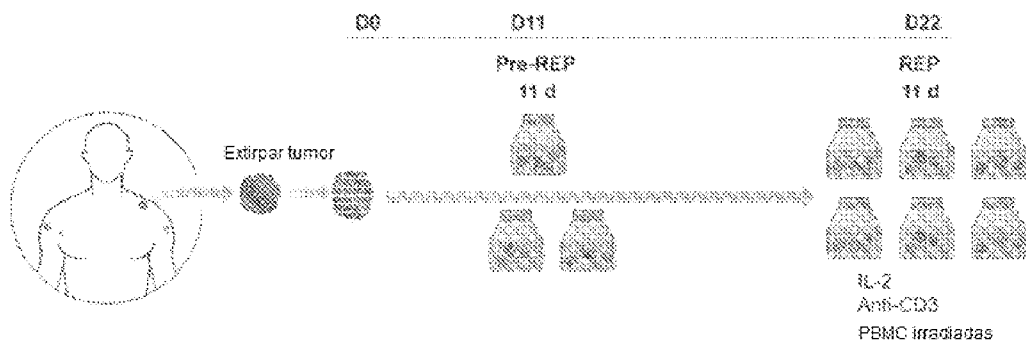


Figura 101

Histología de tumor	# de estudios que demuestran mejoría >20% de crecimiento usando IL-2/IL-15/IL-21 (en comparación con IL-2)
Melanoma	1/5 (20%)
Pulmón	3/8 (38%)
Colorectal	7/11 (63%)
Cervical	1/1 (100%)
Pancreático	2/2 (100%)
Glioblastoma	1/1 (100%)
Mama triple negativo	1/2 (50%)

Figura 102A

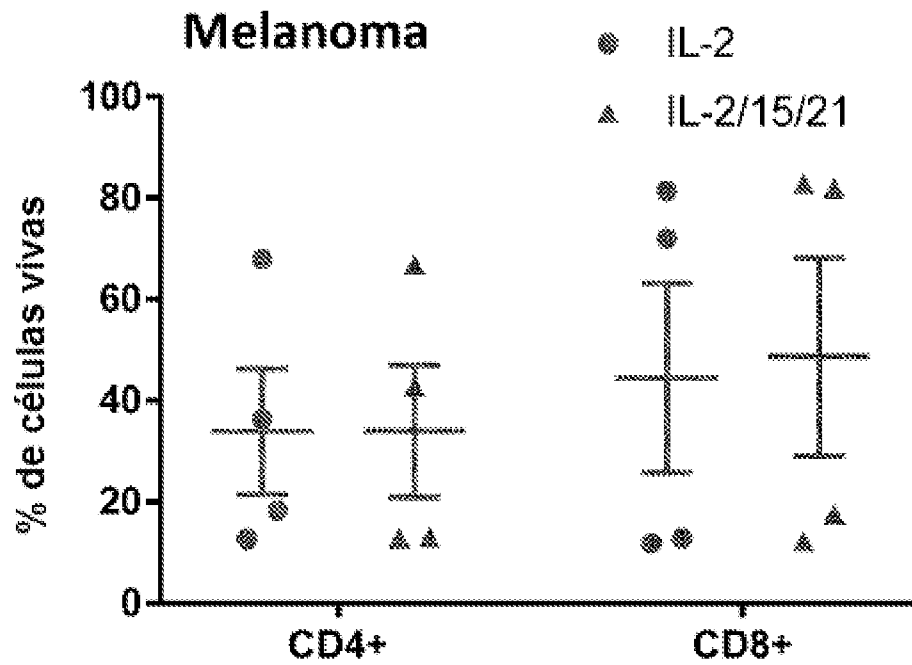


Figura 102B

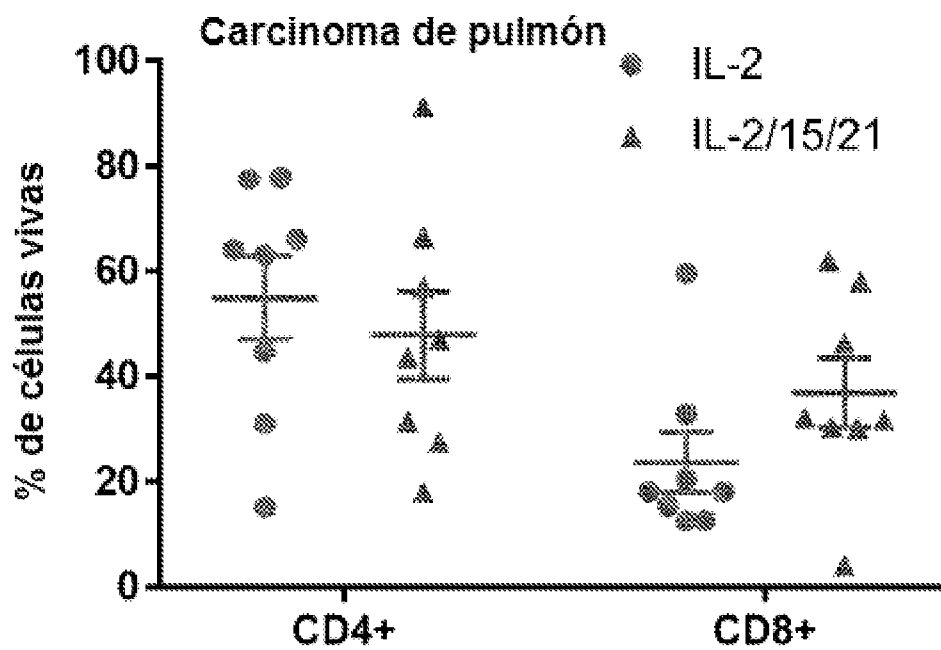


Figura 103A

Melanoma

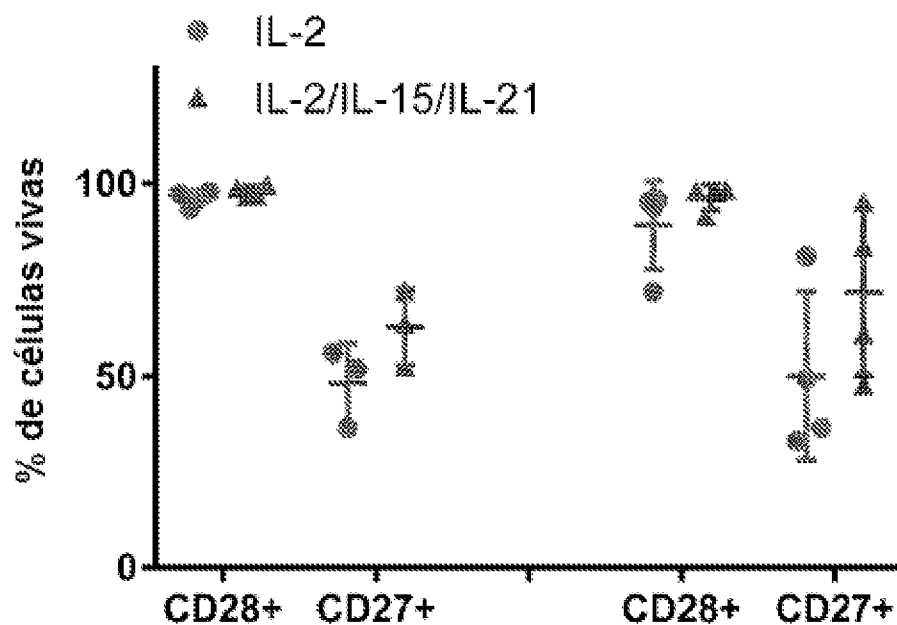


Figura 103B

Carcinoma de pulmón

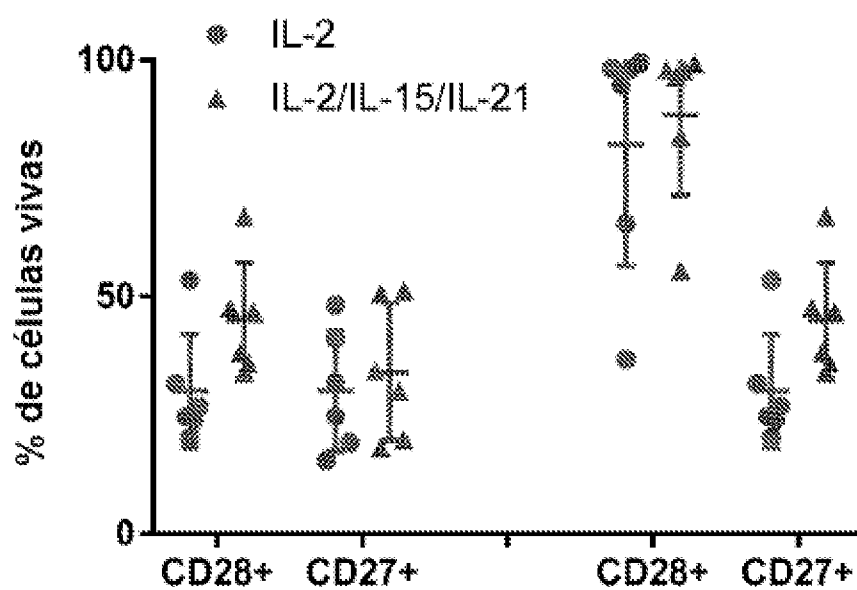


Figura 104A

Melanoma

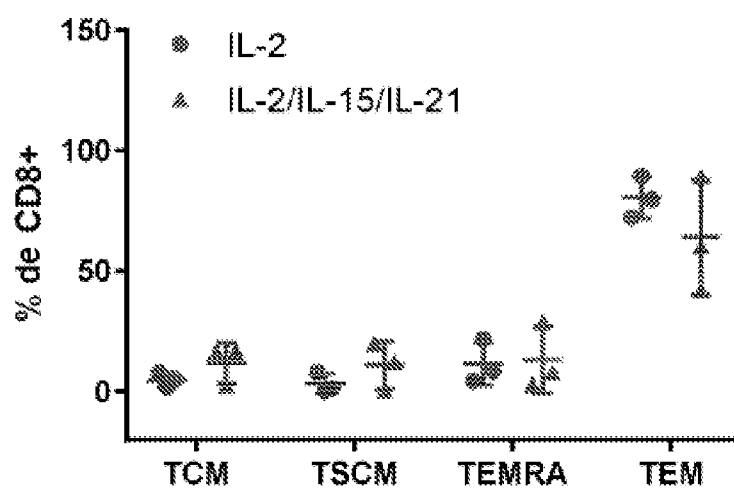


Figura 104B

Carcinoma de pulmón

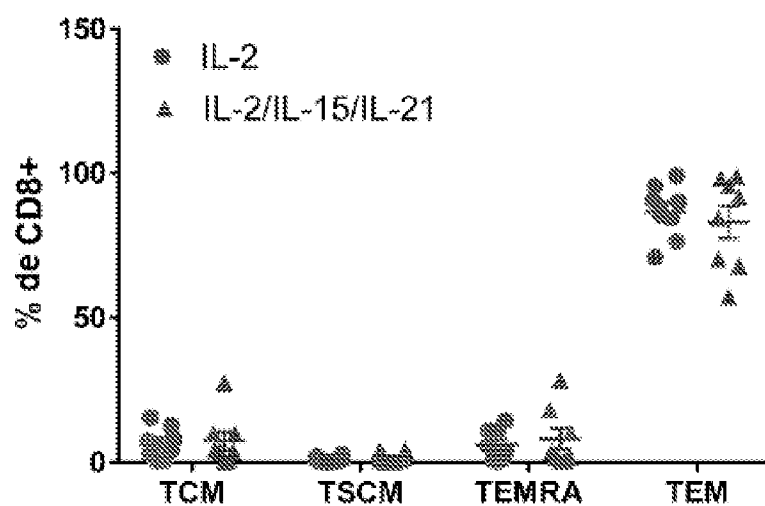


Figura 105A

Melanoma

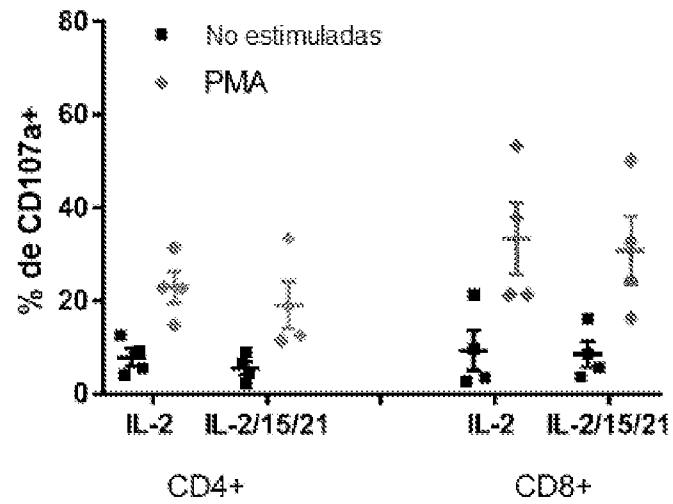


Figura 105B

Carcinoma de pulmón

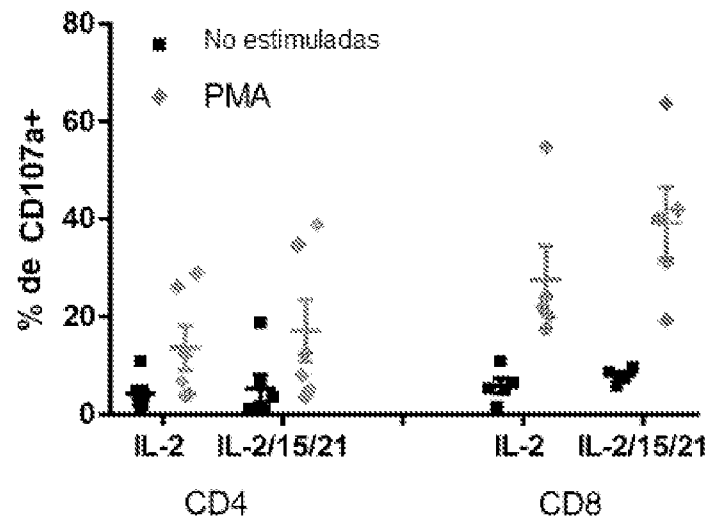


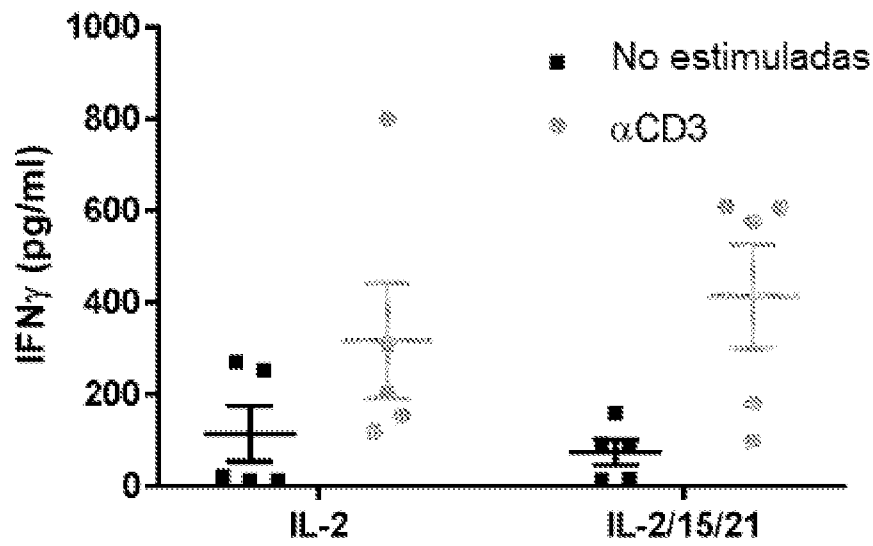
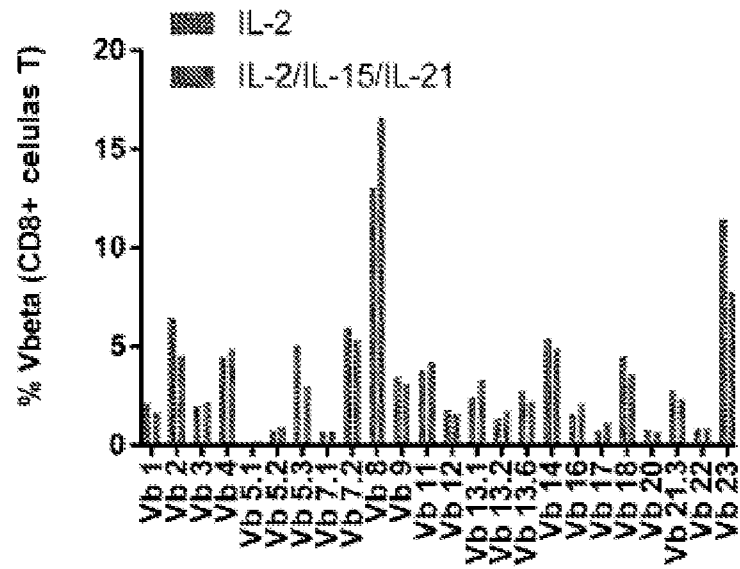
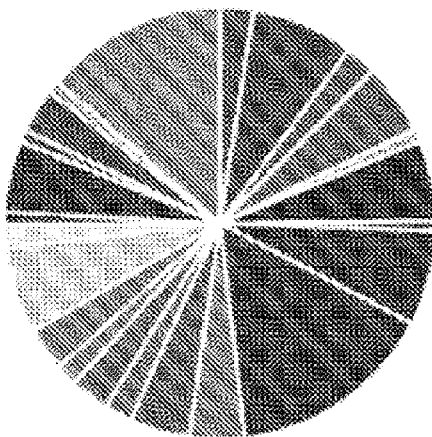
Figura 105C

Figura 106A

Melanoma



IL-2



IL-2/IL-15/IL-21

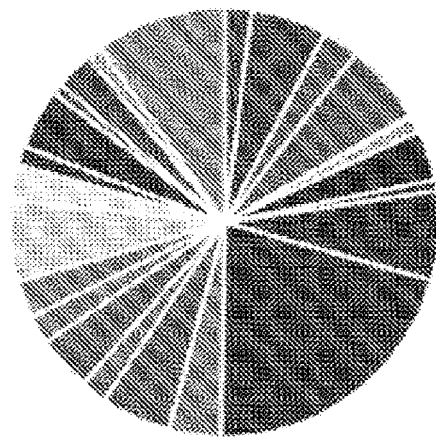
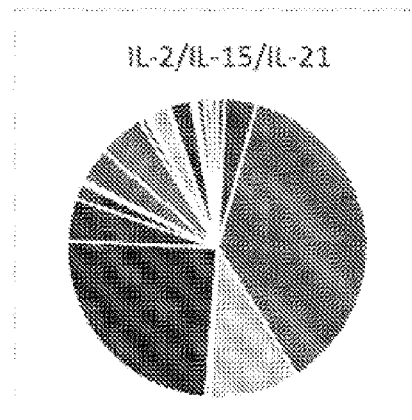
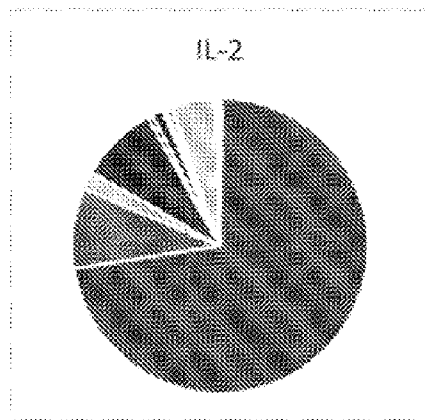
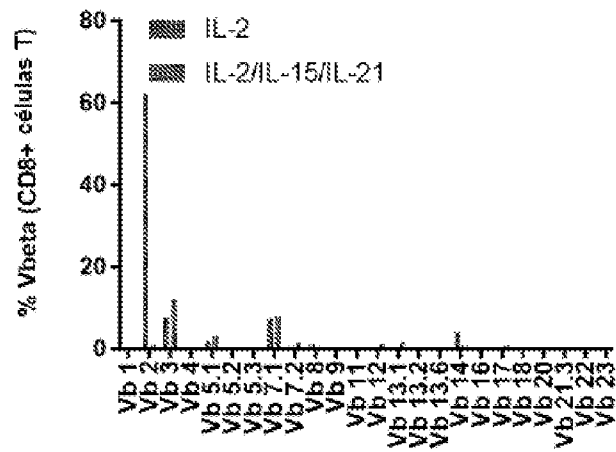


Figura 106B

Carcinoma de pulmón



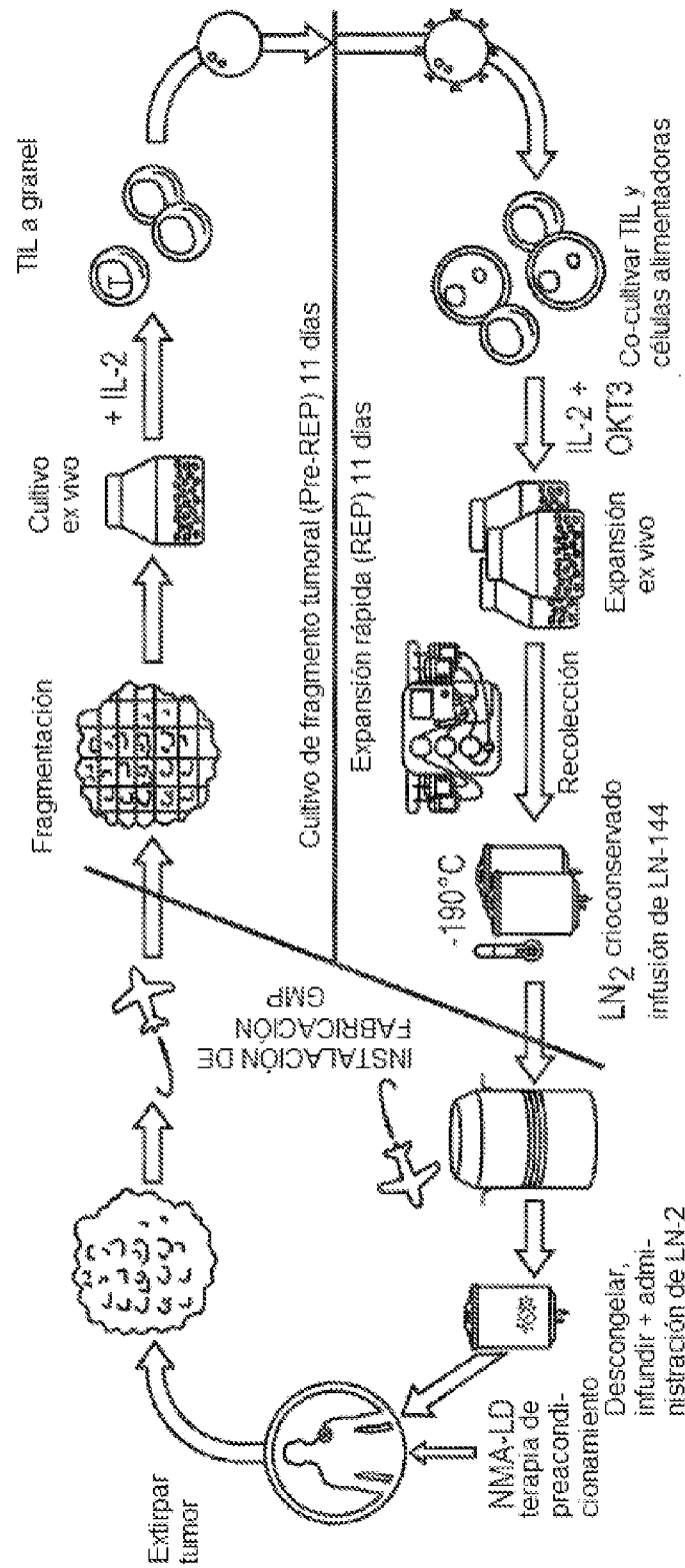
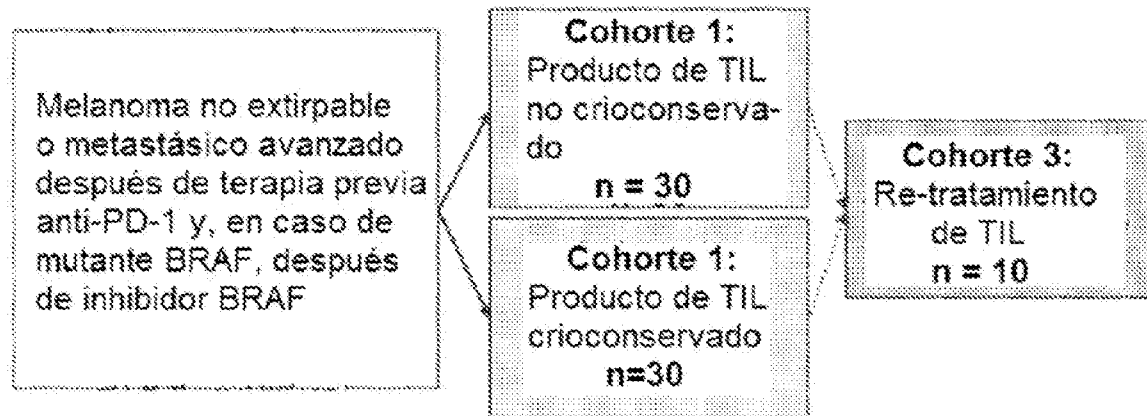


Figura 107

Figura 108



CARACTERÍSTICA	Cohorte histórica 1* N = 16, (%)	Cohorte 2 N = 13, (%)
Género, n (%)		
Macho	7 (44)	5 (39)
Hembra	9 (56)	8 (62)
Edad		
Mediana	55	54
Min, Max	41, 72	35, 66
Terapias previas, n (%)		
# medio de terapias sistémicas previas	3	4
Anti-CTLA-4	14 (88)	13 (100)
Anti-PD-1	21 (100)	13 (100)
Suma de lesión diana de diámetro (mm)		
Media (SD)	104 (68)	141 (102)
Min, Max	15, 225	38, 342
CARACTERÍSTICA	Cohorte histórica 1* N = 16, (%)	Cohorte 2 N = 13, (%)
Clasificación ECOG línea de base, n (%)		
0	9 (56)	8 (62)
1	7 (44)	5 (39)
Estado de BRAF, n (%)		
Mutado	9 (56)	6 (46)
Tipo silvestre	7 (44)	7 (54)
LDH línea de base (U/L [SD])		
1-2 veces ULN	7 (44)	7 (54)
Min, Max	1 (6)	2 (15)
Número de lesiones diana & no diana (en línea de base)		
>3	12(75)	10(77)
Media	5.6	5.5

Figura 109

TÉRMINO PREFERIDO	Cohorte histórica 1 (N = 16)			Cohorte 2 (N = 13)		
	Cualquier grado n (%)	Grado 3/4 n (%)	Grado 5 n (%)	Cualquier grado n (%)	Grado 3/4 n (%)	Grado 5 n (%)
Número de pacientes que reportan al menos un tratamiento emergente AE	14 (87.5)	14 (87.5)	0	12 (85.7)	11 (78.6)	0
Náusea	14 (87.5)	0	0	7 (53.8)	0	0
Conteo disminuido de plaqueta	12 (75.0)	12 (75.0)	0	7 (53.8)	6 (46.2)	0
Anemia	11 (68.8)	8 (50.0)	0	8 (61.5)	7 (53.8)	0
Conteo disminuido de neutrófilo	11 (68.8)	11 (68.8)	0	6 (46.2)	6 (46.2)	0
Neutropenia febril	10 (62.5)	10 (62.5)	0	7 (53.8)	6 (46.2)	0
Conteo disminuido de glóbulos blancos	10 (62.5)	10 (62.5)	0	6 (46.2)	6 (46.2)	0
Escalofríos	9 (56.3)	0	0	6 (46.2)	1 (7.7)	0
Diarrea	8 (50.0)	1 (6.3)	0	4 (30.8)	0	0
Fatiga	7 (43.8)	0	0	7 (53.8)	0	0
Vómito	7 (43.8)	0	0	2 (15.4)	0	0
Constipación	6 (37.5)	0	0	3 (23.1)	0	0
Apetito disminuido	5 (31.3)	0	0	4 (30.8)	0	0
Cefalea	5 (31.3)	0	0	3 (23.1)	0	0
Hipocalcemia	5 (31.3)	0	0	1 (7.7)	0	0
Hipopotasemia	5 (31.3)	0	0	3 (23.1)	0	0
Hipofosfatemia	5 (31.3)	5 (31.3)	0	4 (23.1)	1 (7.7)	0
Hipotensión	5 (31.3)	2 (12.5)	0	3 (23.1)	3 (7.7)	0
Conteo disminuido de linfocitos	5 (31.3)	5 (31.3)	0	3 (23.1)	3 (23.1)	0
Congestión nasal	5 (31.3)	0	0	0	0	0
Pirexia	5 (31.3)	0	0	9 (69.2)	1 (7.7)	0
Tos	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0
Edema periférica	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0
Prurito	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0

Notas: Los eventos adversos se clasifican mediante MedDRA versión 18.1

Pacientes con múltiples eventos para un término preferido dado son contados solo una vez usando el grado máximo en cada término preferido.

Los eventos se clasifican disminuyendo la frecuencia del término según SOC para cualquier grado.

Los eventos adversos emergentes en el tratamiento se refieren a todos los AE que inician a la primera fecha de dosis, o después de esta, de quimioterapia de pre-tratamiento (Fludarabina y Ciclofosfamida) hasta la última dosis de IL2 + 30 días.

Figura 110

Figura 111

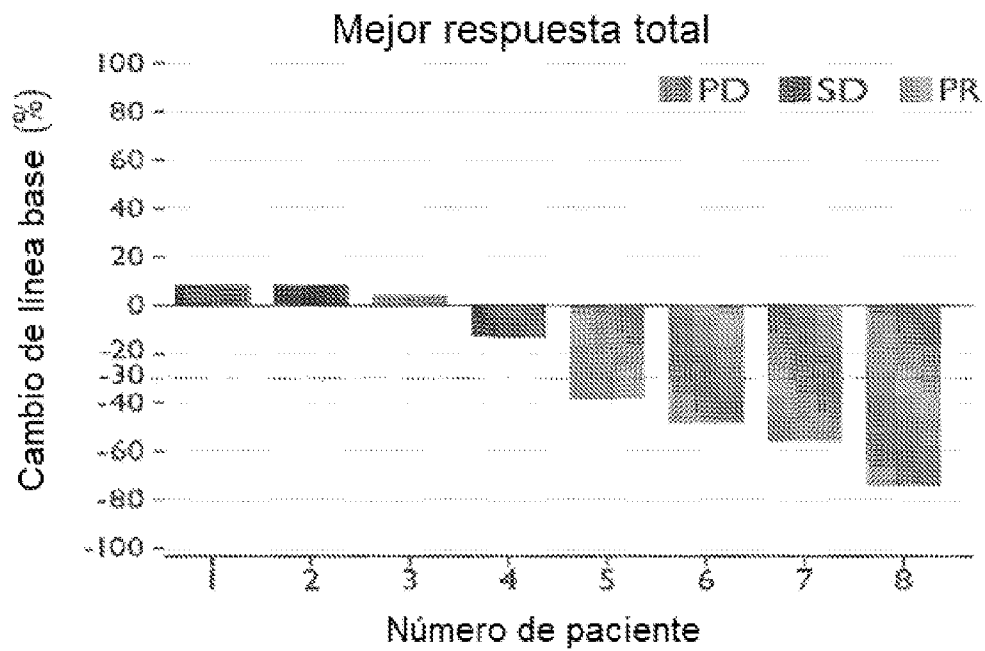
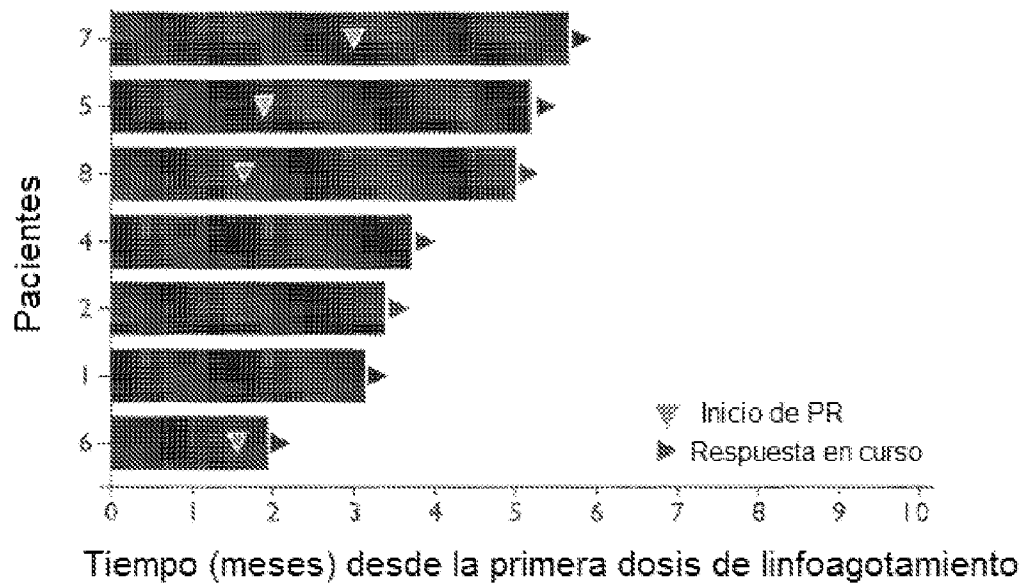


Figura 112



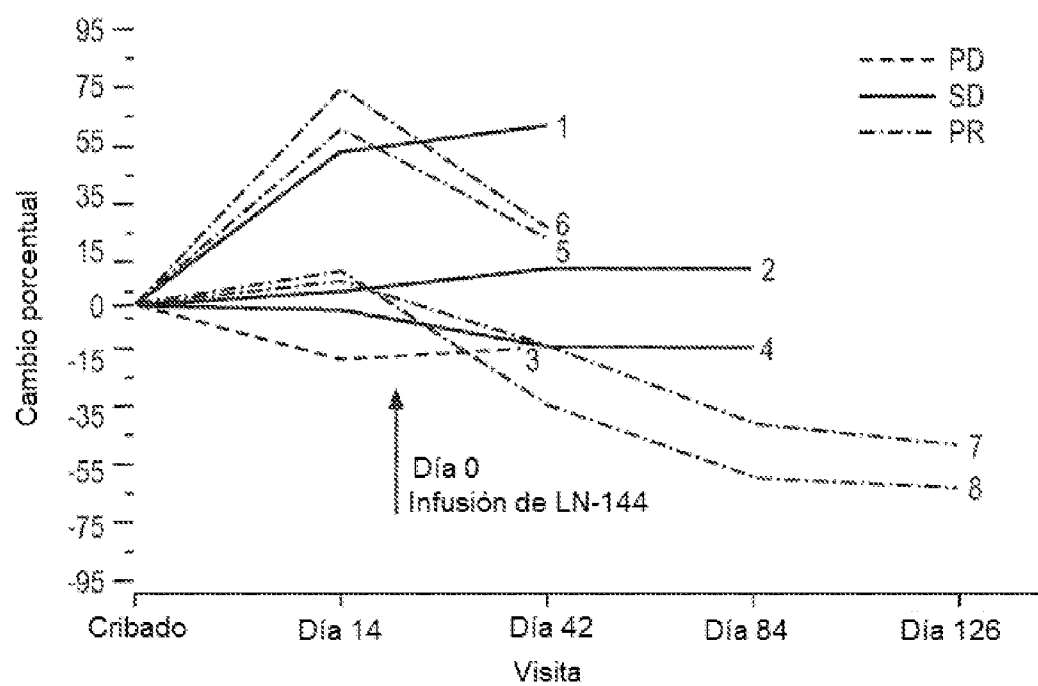


Figura 113

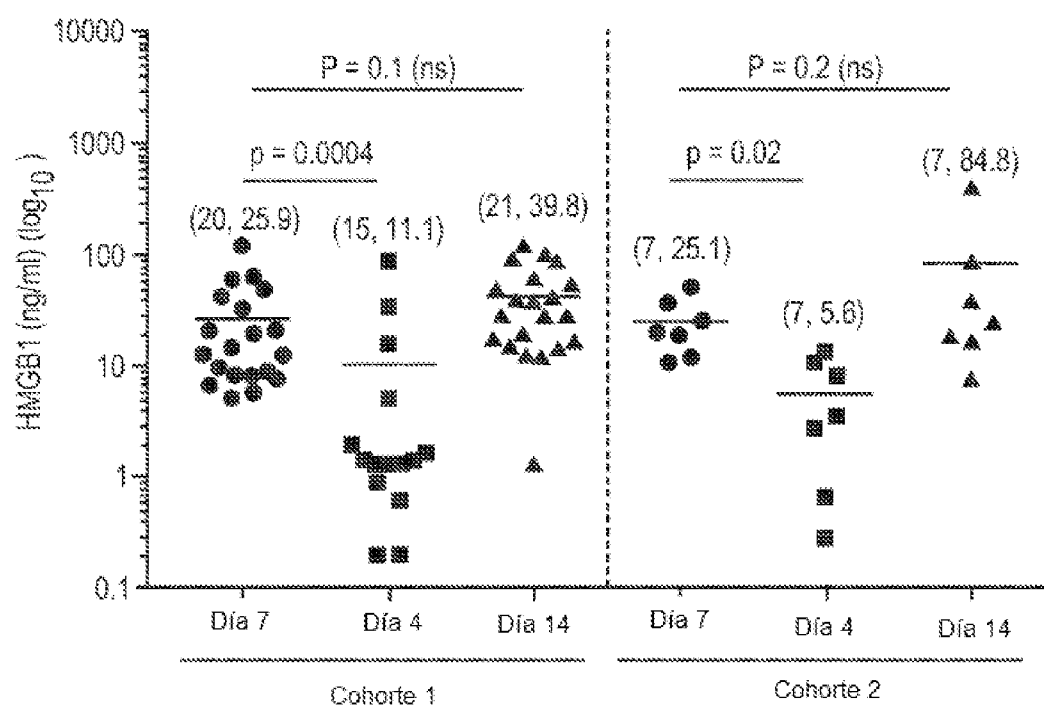


Figura 114

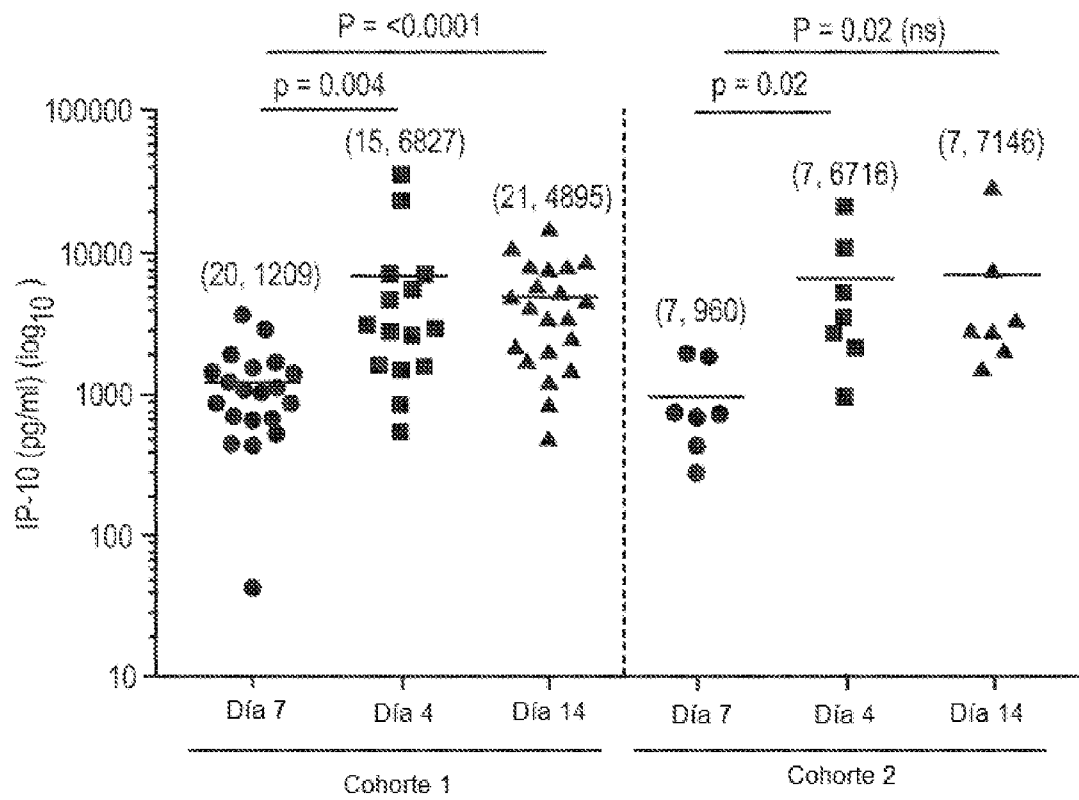


Figura 115

CARACTERÍSTICA	Cohorte 2 N = 17, (%)
Género, n (%)	
Macho	8 (47)
Hembra	9 (53)
Edad	
Mediana	54
Min, Max	35, 66
Terapias previas, n (%)	
# medio de terapias sistémicas previas	3.6
Anti-CTLA-4	15 (88)
Anti-PD-1	16 (94)
Suma de lesión diana de diámetro (mm)	
Mediana (SD)	140 (93)
Min, Max	38, 342
CARACTERÍSTICA	Cohorte 2 N = 17, (%)
Estado de BRAF, n (%)	
0	11 (65)
1	6 (35)
BRAF Status, n (%)	
Mutado	5 (29)
Tipo silvestre	9 (53)
Desconocido	3 (18)
Línea base LDH (U/L [SD])	
1-2 veces ULN	8 (47)
> 2 veces ULN	2 (12)
Número de lesiones diana & no diana (en línea base)	
> 3	12 (71)
Media	5.9

Cohorte 2 tiene:

3.6 mediana de terapias previas

Alta carga tumoral en línea de base tal como se refleja por la suma de diámetros de 140 mm para lesiones diana

Figura 116

TÉRMINOS PREFERIDOS	Cohorte 2 (N = 17)		
	Cualquier grado n (%)	Grado 3/4 n (%)	Grado 5 n (%)
Número de pacientes que informan al menos un tratamiento emergente AE	16 (94.1)	16 (94.1)	0
Pirexia	13 (76.5)	1 (5.9)	0
Anemia	11 (64.7)	10 (58.8)	0
Conteo disminuido de neutrófilo	10 (58.8)	10 (58.8)	0
Conteo disminuido de plaqueta	10 (58.8)	8 (47.1)	0
Neutropenia febril	10 (58.8)	8 (47.1)	0
Fatiga	10 (58.8)	0	0
Escalofríos	9 (52.9)	1 (5.9)	0
Náusea	9 (52.9)	0	0
Conteo disminuido de glóbulos blancos	8 (47.1)	8 (47.1)	0
Conteo disminuido de linfocitos	6 (35.3)	6 (35.3)	0
Diarrea	6 (35.3)	0	0
Apetito disminuido	6 (35.3)	0	0

Notas: Los pacientes con múltiples eventos para un término preferido dado se cuentan solo una vez usando el grado máximo según cada término preferido. Eventos adversos emergentes en tratamiento se refieren a todos los AE a partir de o después de la fecha de primera dosis de quimioterapia (Fludarabina y Ciclofosfamida) hasta la última dosis de IL-2 + 30 días

Figura 117

Figura 118

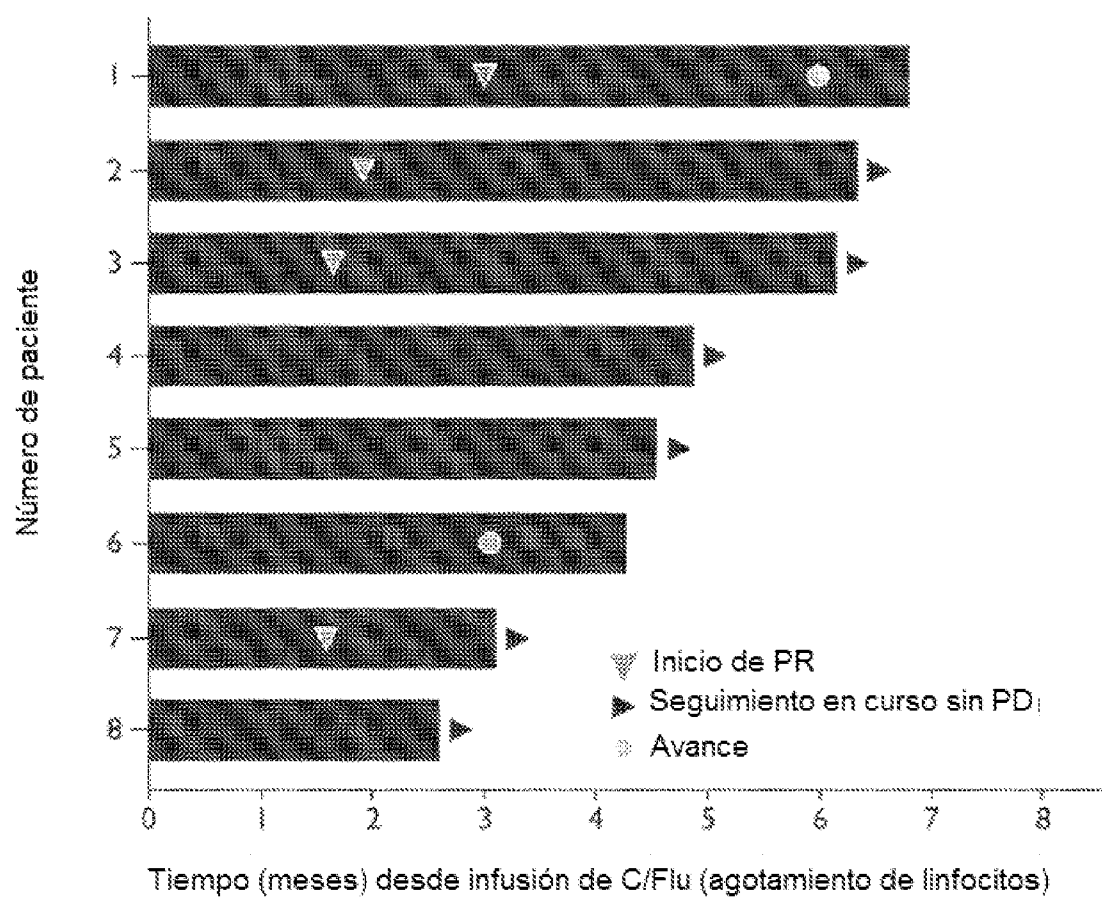


Figura 119

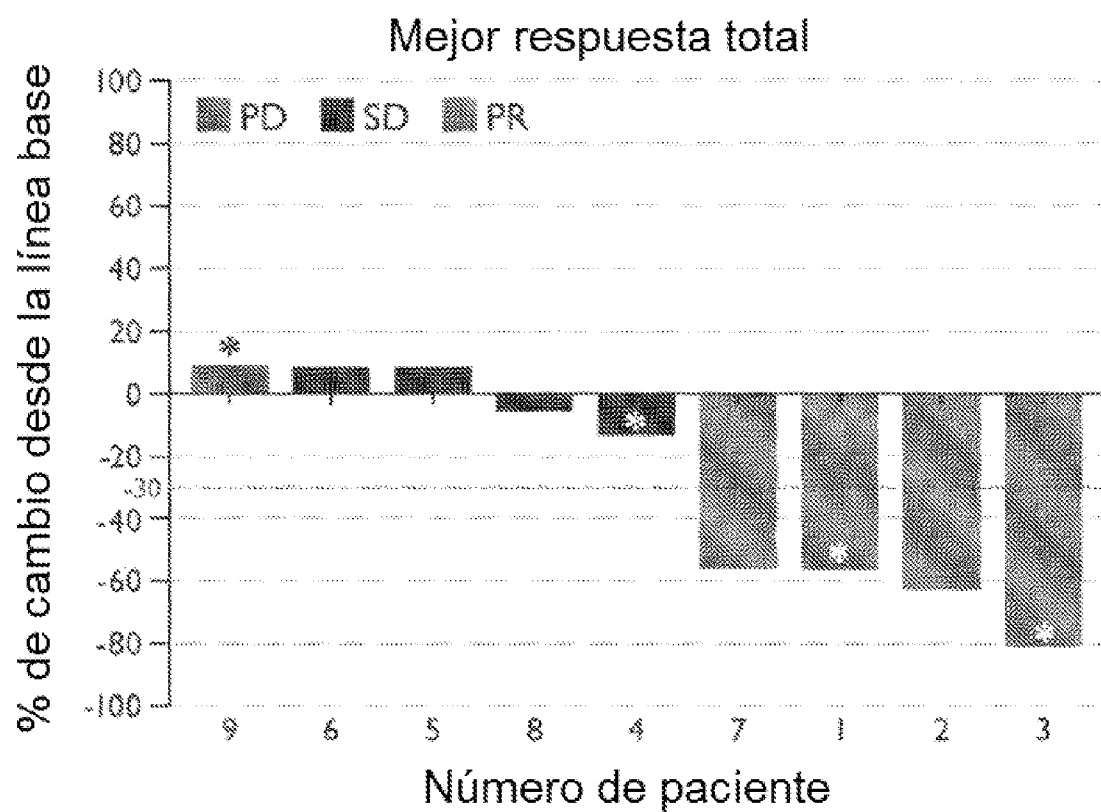


Figura 120

RESPUESTA	PACIENTES, N=10 n (%)
Tasa de respuesta objetiva	4 (40%)
Tasa de control de enfermedad	8 (80%)
Respuesta parcial	4 (40%)
Enfermedad estable	4 (40%)
Enfermedad progresiva	1 (10%)
No evaluable*	1 (10%)

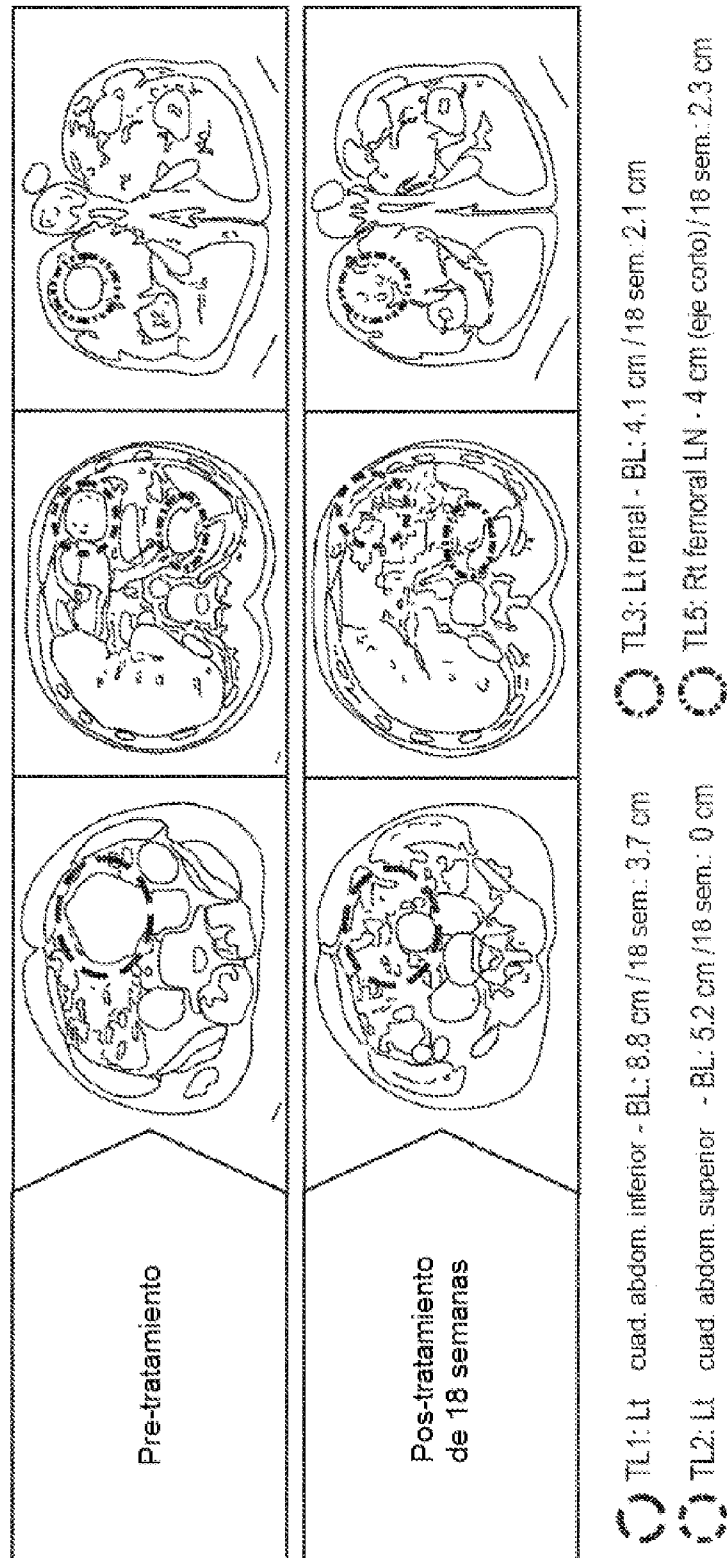
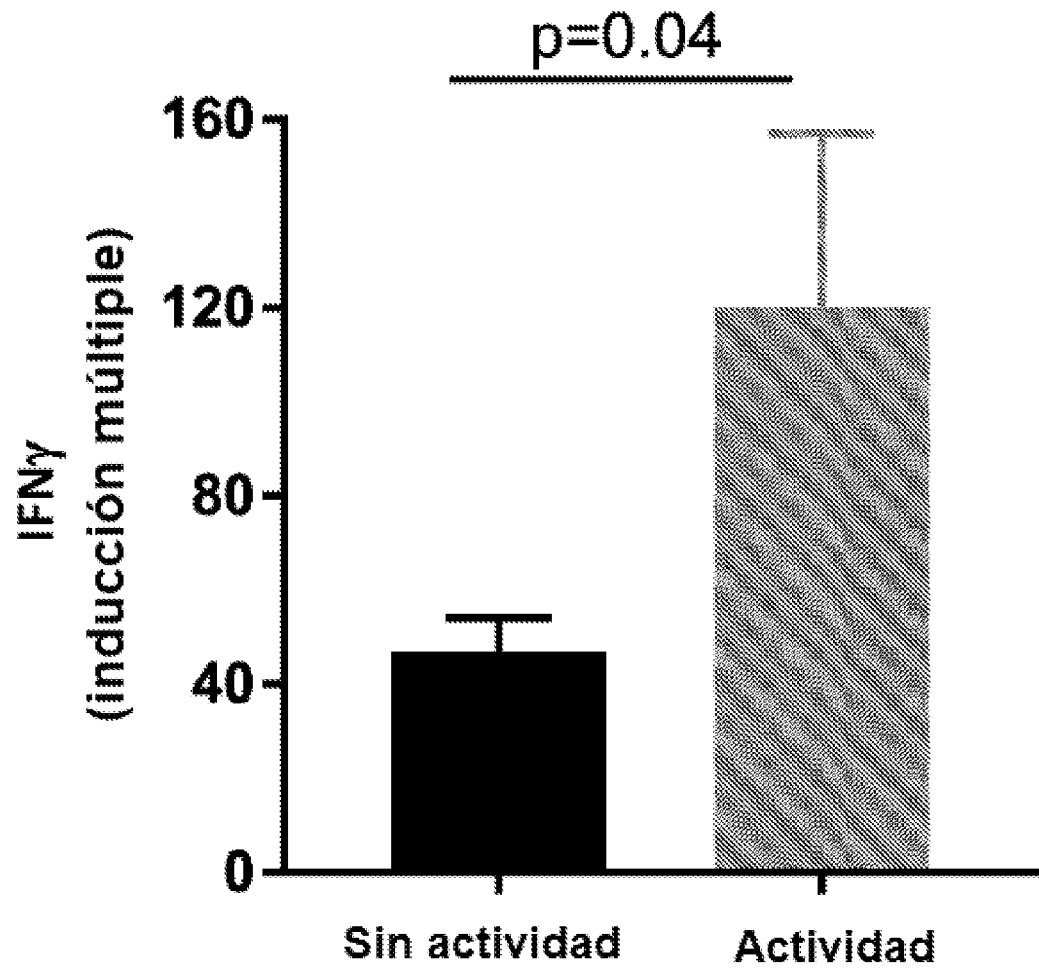


Figura 121

Figura 122



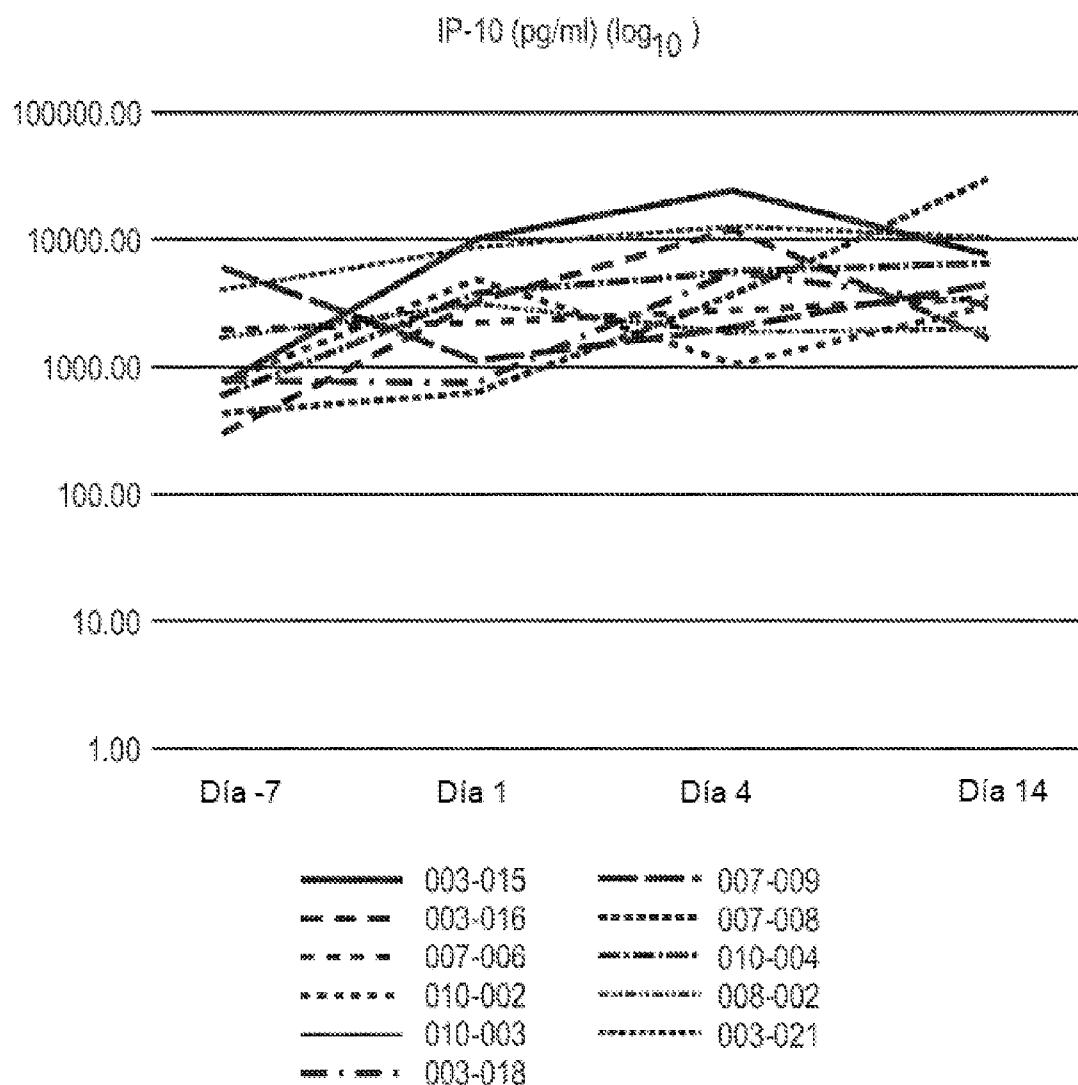


Figura 123

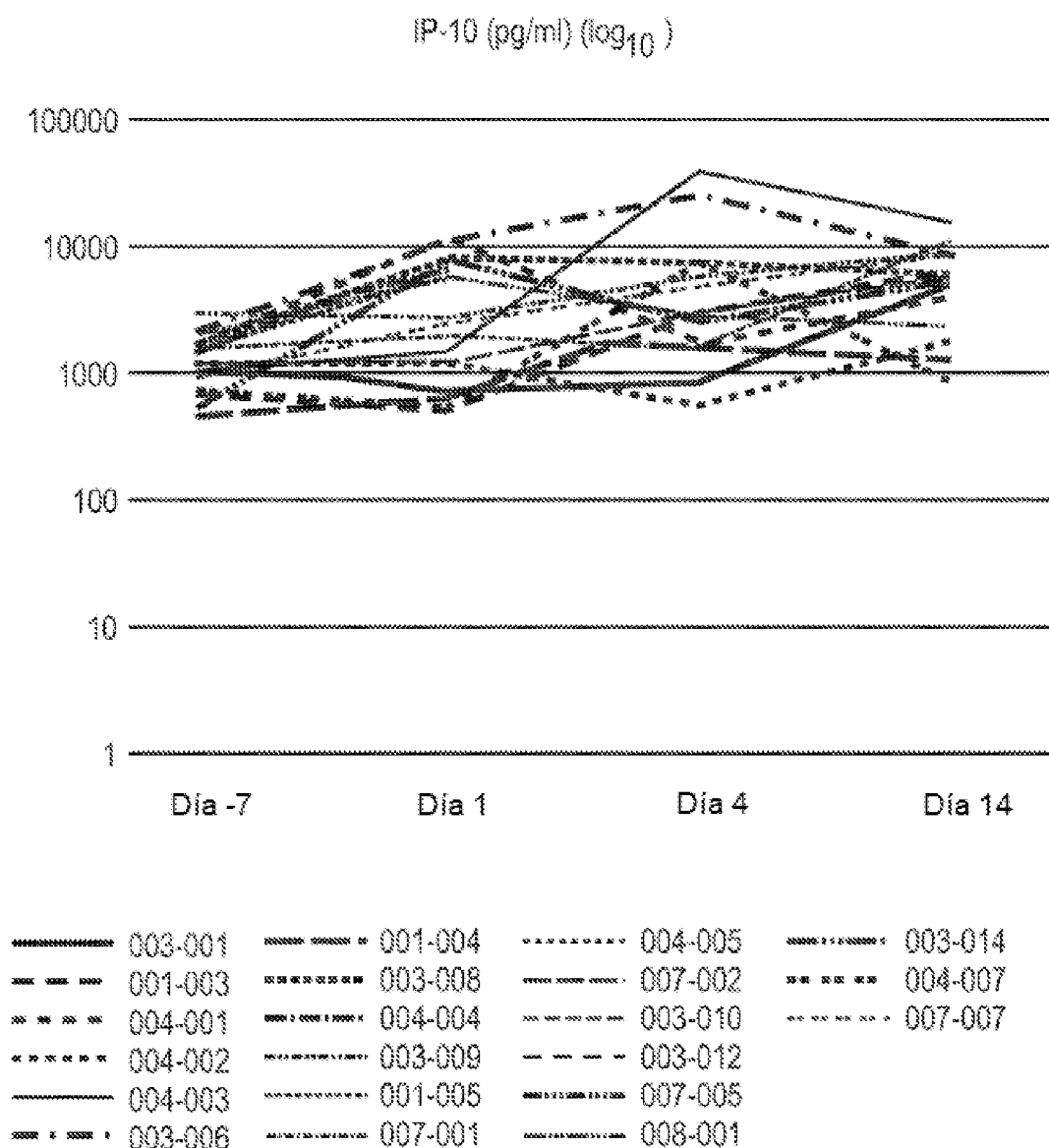


Figura 124

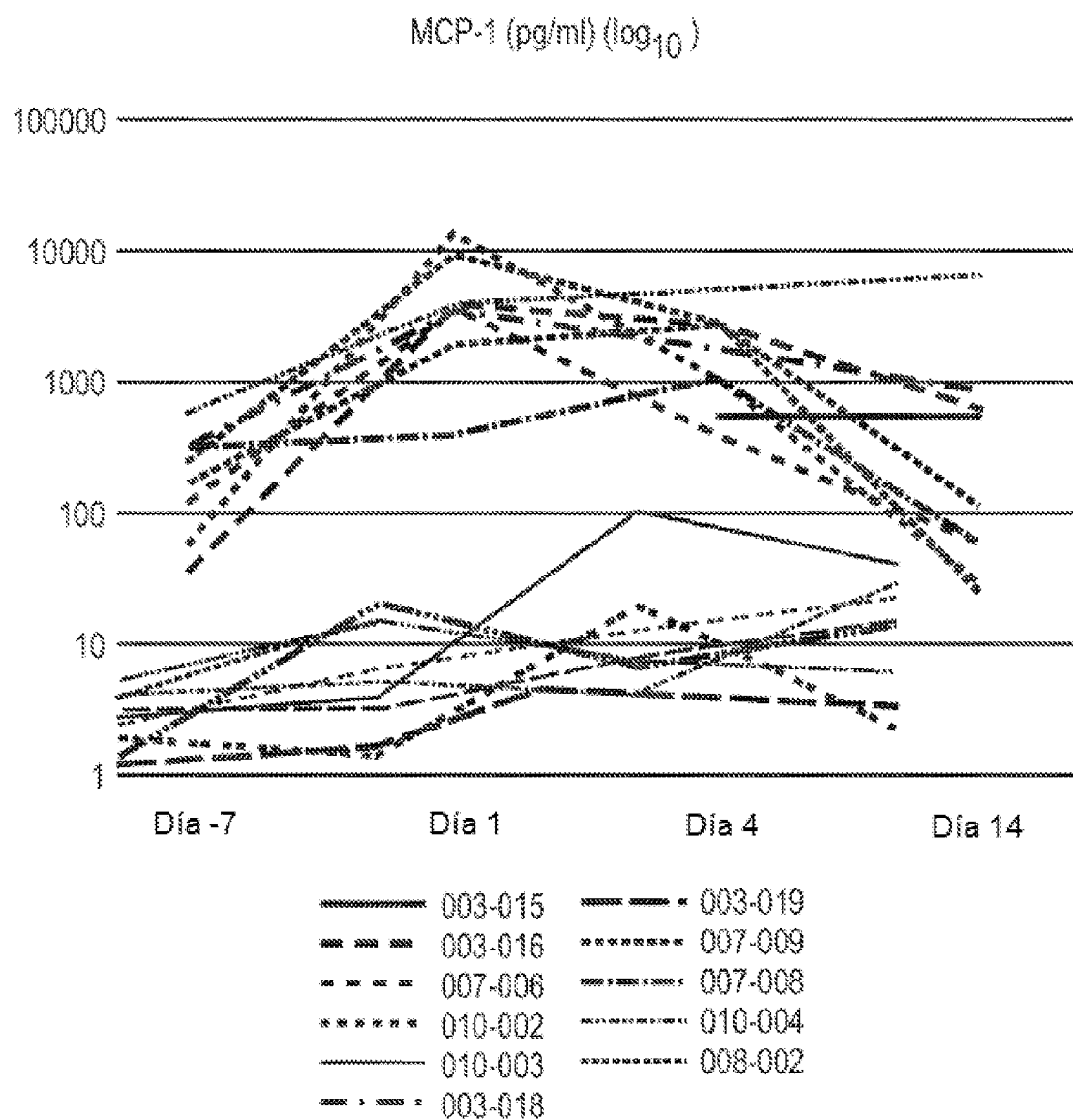


Figura 125

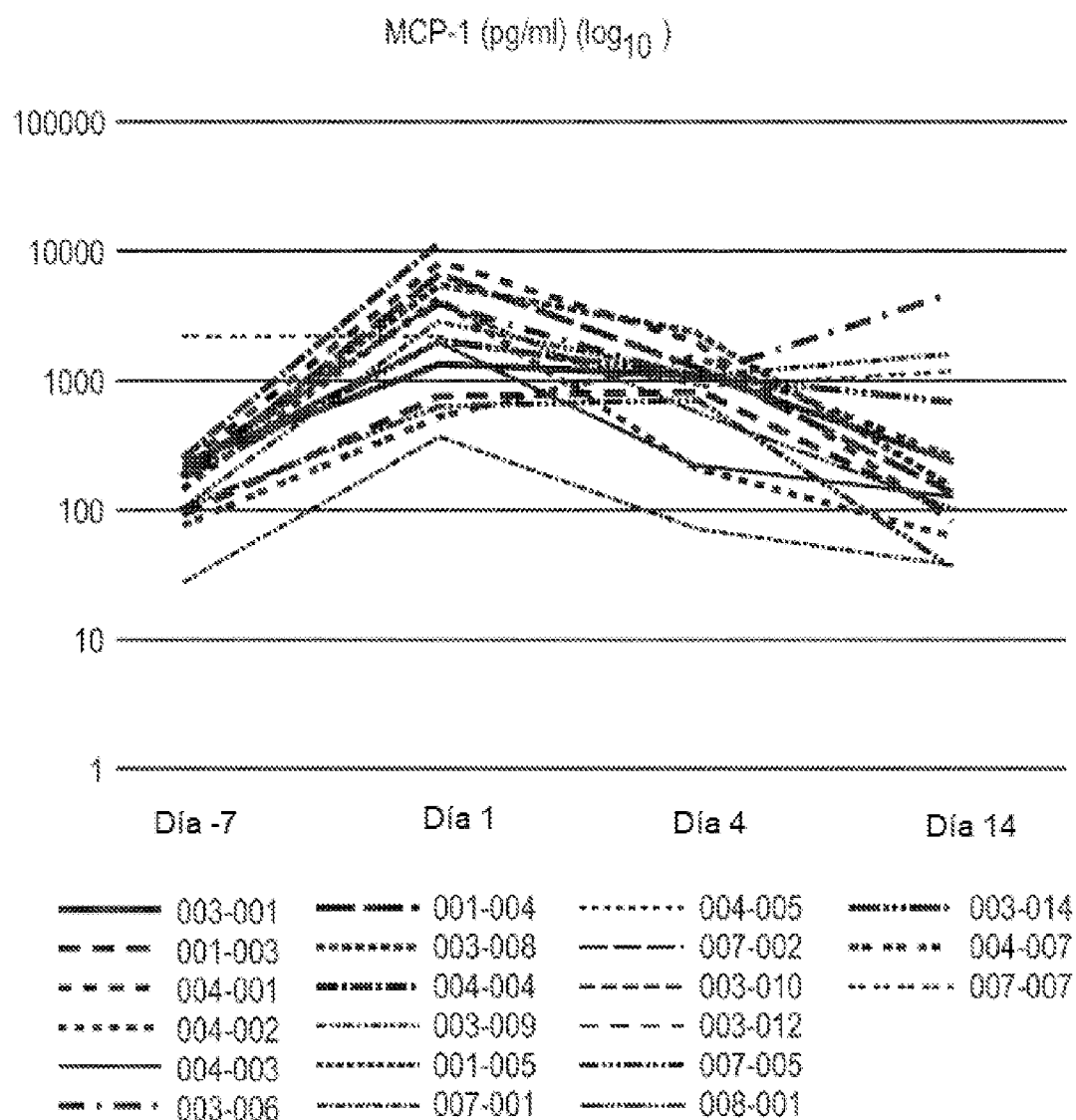


Figura 126

Carcinoma cervical (C-145-04)

PI No INFUSIÓN	# CÉLULAS INFUNDIDAS	RESPUESTA DÍA 42	RESPUESTA DÍA 84	RESPONSE DÍA 126	RESPUESTA A 6 MESES	RESPUESTA A 9 MESES	BOR
1	9-Ago-17	32.6 millardos	PR	PR	-	-	-
2	19-Sep-17	41.4 millardos	SD (necesita confirmación)	-	-	-	-

HN5CC (C-145-03)

PI No INFUSIÓN	# CÉLULAS INFUNDIDAS	RESPUESTA DÍA 28	RESPUESTA DÍA 56	RESPUESTA DÍA 84	RESPUESTA A 4 MESES	RESPUESTA A 6 MESES	BOR
1	31-May-17	21 millardos	SD	PD	Discon.	-	SD
2	20-Jun-17	21 millardos	PR	SD	SD	Fallecido..	SD
3	1-Ago-17	30 millardos	PR	PR	PR	PD	PR
4	14-Sep-17	65 millardos	PR	PR	PR	-	PR
5	03-Nov-17	10 millardos	-	-	-	-	-
6	07-Nov-17	37 millardos	-	-	-	-	-
7	08-Nov-17	21.5 millardos	-	-	-	-	-

Mediana de terapias previas para HN5CC; 4, todas tuvieron mala anti-PD-1. Los datos son vivos y se someten a cambio

Figura 127