



MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3730608 (13) T2

(51) Int. Cl.: C12N 5/0783 (2010.01.01)
C12M 1/04 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2020 1130</p> <p>(22) Data de depozit: 2018.01.05</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 20161179.5, 2018.01.05</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3730608, 2020.10.28</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201762478506 P; 201762539410 P; 201762548306 P; 201762554538 P; 201762559374 P; 201762567121 P; 201762577655 P; 201762582874 P; 201762596374 P</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.03.29; 2017.07.31; 2017.08.21; 2017.09.05; 2017.09.15; 2017.10.02; 2017.10.26; 2017.11.07; 2017.12.08</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: US; US; US; US; US; US; US; US; US</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2025, 2025.03.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 43/2024, 2024.10.23</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 11/2020, 2020.11.30</p>
<p>(71) Solicitant: IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC., US</p> <p>(72) Inventatori: WARDELL Seth, US; BENDER James, US; LOTZE Michael T., US</p> <p>(73) Titular: IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC., US</p> <p>(74) Mandatar autorizat: FOCȘA Valentin</p>	

(54) Procese de producere de limfocite infiltrante tumorale și utilizarea acestora în imunoterapie

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la construcții de recunoaștere a antigenului împotriva antigenelor asociate tumorii (TAA), în special împotriva Antigenului Melanomului Exprimat Preferențial (PRAME).

Invenția furnizează în special molecule noi pe bază de receptor de celule T (TCR) care sunt selective și specifice pentru antigenul exprimat tumoral conform invenției.

TCR conform invenției și fragmentele de legare a TAA derivate din acestea sunt utile pentru diagnosticarea, tratamentul și prevenirea bolilor canceroase exprimate de TAA.

MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

În plus sunt furnizați acizi nucleici care codifică structurile de recunoaștere a antigenului ale invenției, vectori care cuprind acești acizi nucleici, celule recombinante care exprimă structurile de recunoaștere a antigenului și compoziții farmaceutice care cuprind compuși conform invenției.

Sunt prezentate metode îmbunătățite și/sau simplificate pentru extinderea TIL-urilor și producerea de populații terapeutice de TIL, inclusiv metode noi pentru extinderea populațiilor TIL într-un sistem închis, care conduc la o eficacitate îmbunătățită, la îmbunătățirea fenotipului și la creșterea sănătății metabolice a TIL-urilor într-un timp mai scurt, permițând în același timp reducerea contaminării microbiene, precum și reducerea costurilor. Astfel de TIL-uri își găsesc utilizare în regimurile de tratament terapeutic.

Secvențe: 13

Revendicări: 18

Figuri: 127

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de titular)****LISTA SECVENȚELOR**

5 Prezentă cerere conține o listă de secvențe care a fost depusă electronic în format ASCII. Exemplarul ASCII, creat în data de 4 ianuarie 2018 este denumit 116983-5017_ST25.txt și are o dimensiune de 14 kilobytes.

BAZA INVENȚIEI

10 Tratamentul cancerelor refractare, masive, folosind transfer adoptiv al limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) reprezintă o metodă terapeutică eficientă pentru pacienți cu prognostic slab. Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393. Este necesar un număr mare de TIL pentru o imunoterapie reușită, precum și un proces solid și fiabil pentru comercializare. Aceasta constituie o provocare din cauza problemelor tehnice, logistice și normative legate de expansiunea celulelor. Expansiunea TIL bazată pe IL-2, urmată de un "proces de expansiune rapidă" (REP) a devenit o metodă preferată pentru expansiunea TIL datorită vitezei și eficienței. 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. REP poate duce la o expansiune de 1.000 de ori a TIL într-o perioadă de 14 zile, deși necesită un surplus mare (*de ex.*, de 200 de ori) de celule mononucleare din sângele periferic alogenice iradiate (PBMC, cunoscute și ca celule mononucleare (MNCs)), adesea de la donatori multipli, ca celule feeder, precum și anticorp anti-CD3 (OKT3) și doze mari de IL-2. Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42. TIL care au suferit o procedură REP au dus la o terapie celulară adoptivă reușită în urma imunosupresiei gazdei la pacienți cu melanom. Parametrii actuali de acceptare a transferului se bazează pe citirile compoziției TIL (*de ex.*, pozitivitate CD28, CD8 sau CD4) și pe gradul de expansiune și viabilitatea produsului REP. Documentația brevetului US nr. 2012/244133 descrie un proces de expansiune TIL incluzând o etapă a procesului de expansiune rapidă de circa 14 zile și o durată totală de la obținerea unei probe tumorale până la populația TIL amplificată între 28 și 42 de zile. WO2016/053338 descrie o metodă de între 2 și 3 săptămâni și o a doua expansiune de circa două săptămâni.

25 Procesele actuale de preparare TIL sunt limitate de lungime, cost, probleme de sterilitate și alți factori descriși în prezenta, astfel încât potențialul de comercializare a acestor procese este sever limitat din aceste motive și altele și, la momentul actual, nu există un proces comercial. Este nevoie urgentă de prevedere a unor procese de preparare TIL și de terapii bazate pe aceste procese, care să fie adecvate pentru preparare la scară de comercială și autorizate pentru utilizare la pacienți umani în centre clinice multiple.

SCURT REZUMAT AL INVENȚIEI

35 Prezentă invenție prevede metode îmbunătățite și/sau simplificate de expansiune TIL și de producere a populațiilor terapeutice de TIL.

Într-un prim aspect al prezentei invenții, se prevede o metodă de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) într-o populație terapeutică de TIL cuprinzând:

(a) adăugarea fragmentelor tumorale procesate cuprinzând o primă populație de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect într-un sistem închis;

40 (b) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de 3-11 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (a) la etapa (b) are loc fără deschiderea sistemului;

45 (c) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de 7-11 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

50 (d) recoltarea celei de-a treia populații de TIL obținute de la etapa (c), unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) transferul celei de-a treia populații de TIL recoltate de la etapa (d) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

55 (f) crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (e) folosind un proces de crioconservare, unde populația terapeutică de TIL recoltată în etapa (d) cuprinde suficiente TIL pentru un dozaj terapeutic eficient al TIL, unde metoda cuprinde evaluarea TIL cu privire la viabilitate și unde viabilitatea populației terapeutice de TIL după decongelare este mai mare decât sau egală cu 70%.

În unele aplicări, metoda mai cuprinde evaluarea TIL crioconservate decongelate cu privire la viabilitate.

În unele aplicări, nu se efectuează o selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL, a populației TIL recoltate și/sau a populației TIL terapeutice în timpul nici uneia dintre etapele (a) până la (f).

În unele aplicări, APC sunt celule mononucleare din sânge periferic (PBMC).

În unele aplicări, PBMC sunt suplimentate la un raport de 1:25 TIL:PBMC.

În unele aplicări, etapele (a) până la (e) se efectuează într-o perioadă de 15 zile până la 22 de zile.

În unele aplicări, etapele (a) până la (e) se efectuează într-o perioadă de 22 de zile.

În unele aplicări, cancerul este selectat din grupul constând din melanom, cancer ovarian, cancer de col uterin, cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer pulmonar, cancer vezical, cancer mamar, cancer cauzat de papilomavirus uman, cancer la cap și gât (inclusiv carcinom celular scuamos la cap și gât (HNSCC)), cancer renal și carcinom cu celule renale.

În unele aplicări, cancerul este selectat din grupul constând din melanom, HNSCC, cancer de col uterin și NSCLC.

În unele aplicări, cancerul este melanom.

În unele aplicări, cancerul este HNSCC.

În unele aplicări, cancerul este cancer de col uterin.

În unele aplicări, cancerul este NSCLC.

În unele aplicări, înainte de etapa (a), metoda cuprinde obținerea primei populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect prin procesarea unei probe tumorale obținute de la subiect în fragmente tumorale multiple.

În unele aplicări, riscul de contaminare microbiană este redus comparativ cu un sistem deschis.

În unele aplicări, a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL care cuprinde o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute în populația terapeutică de TIL prezintă una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

În unele aplicări, viabilitatea populației terapeutice de TIL după decongelare este mai mare de 70%.

În unele aplicări, viabilitatea populației terapeutice de TIL după decongelare este mai mare de 86%.

OBIECT SUPPLEMENTAR

Se divulgă de asemenea în prezenta, dar nu este revendica, o metodă de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) într-o populație terapeutică de TIL cuprinzând:

(a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un pacient prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

(b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

(c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului.

Metoda mai poate cuprinde etapa de crioconservare a pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată în etapa (f) folosind un proces de crioconservare.

Procesul de crioconservare se poate efectua folosind un raport 1:1 între populația TIL recoltată și mediul de crioconservare.

Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule mononucleare din sângele periferic (PBMC). PBMC pot fi iradiate și alogene. PBMC pot fi adăugate în cultura celulară în oricare dintre zilele 9 - 14 în etapa (d). Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule de prezentare a antigenului artificiale.

Recoltarea din etapa (e) se poate efectua folosind un sistem de procesare celulară pe bază de membrană.

Recoltarea din etapa (e) se poate efectua folosind un sistem de procesare celulară LOVO.

Fragmentele multiple pot cuprinde circa 4 până la circa 50 fragmente, unde fiecare fragment are un volum de circa 27 mm³.

Fragmentele multiple pot cuprinde circa 30 până la circa 60 fragmente cu un volum total de circa 1300 mm³ până la circa 1500 mm³.

Fragmentele multiple pot cuprinde circa 50 fragmente cu un volum total de circa 1350 mm³.

Fragmentele multiple pot cuprinde circa 50 fragmente cu o masă totală de circa 1 gram până la circa 1.5 grame.

Mediul de cultură celulară poate fi prevăzut într-un recipient selectat din grupul constând dintr-un recipient G și o pungă celulară Xuri.

Mediul de cultură celulară în etapa (d) mai poate cuprinde IL-15 și/sau IL-21.

Concentrația IL-2 poate fi circa 10.000 IU/mL până la circa 5.000 IU/mL.

Concentrația IL-15 poate fi circa 500 IU/mL până la circa 100 IU/mL.

Concentrația IL-21 poate fi circa 20 IU/mL până la circa 0.5 IU/mL.

Punga de perfuzie în etapa (f) poate fi o pungă de perfuzie conținând HypoThermosol.

Mediul de crioconservare poate cuprinde dimetilsulfoxid (DMSO). Mediul de crioconservare poate cuprinde 7% până la 10% dimetilsulfoxid (DMSO).

Prima perioadă în etapa (c) și a doua perioadă în etapa (e) se pot efectua fiecare individual într-o perioadă de 10 zile, 11 zile sau 12 zile.

Prima perioadă în etapa (c) și a doua perioadă în etapa (e) se pot efectua fiecare individual într-o perioadă de 11 zile.

Etapele (a) până la (f) se pot efectua într-o perioadă de circa 10 zile până la circa 22 zile.

Etapele (a) până la (f) se pot efectua într-o perioadă de circa 20 zile până la circa 22 zile.

Etapele (a) până la (f) se pot efectua într-o perioadă de circa 15 zile până la circa 20 zile.

Etapele (a) până la (f) se pot efectua într-o perioadă de circa 10 zile până la circa 20 zile.

Etapele (a) până la (f) se pot efectua într-o perioadă de circa 10 zile până la circa 15 zile.

Etapele (a) până la (f) se pot efectua în 22 zile sau mai puțin.

Etapele (a) până la (f) se pot efectua în 20 zile sau mai puțin.

Etapele (a) până la (f) se pot efectua în 15 zile sau mai puțin.

Etapele (a) până la (f) se pot efectua în 10 zile sau mai puțin.

Etapele (a) până la (f) și crioconservarea se pot efectua în 22 zile sau mai puțin.

Populația terapeutică de TIL recoltată în etapa (e) poate cuprinde suficiente TIL pentru un dozaj terapeutic eficient al TIL.

Numărul de TIL suficient pentru un dozaj terapeutic eficient poate fi este de la circa 2.3×10^{10} la circa 13.7×10^{10} .

Etapele (b) până la (e) se pot efectua într-un singur recipient, unde efectuarea etapelor (b) până la (e) într-un singur recipient poate duce la o creștere a producției TIL per tumoare rezecată față de efectuarea etapelor (b) până la (e) în mai multe recipiente.

Celulele de prezentare a antigenului se pot adăuga în TIL în a doua perioadă în etapa (d) fără deschiderea sistemului.

A treia populație de TIL în etapa (d) poate asigura eficiență mărită, producție interferon-gamma mărită, policlonalitate mărită, IP-10 mediu mărit și/sau MCP-1 mediu mărit la administrare la un subiect.

A treia populație de TIL în etapa (d) poate asigura o producție interferon-gamma de cel puțin cinci ori mai mare sau mai mult la administrare la un subiect.

A treia populație de TIL în etapa (d) poate fi o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală din populația terapeutică de TIL pot prezintă una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a treia populație de TIL pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Riscul de contaminare microbiană poate fi redus față de un sistem deschis.

5 TIL din etapa (g) pot fi administrate unui pacient.

Fragmentele multiple pot cuprinde circa 4 fragmente.

Se divulgă de asemenea în prezenta, deși fără a se revendica, o metodă de tratare a unui subiect cu cancer, metoda cuprinzând administrarea limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) amplificate cuprinzând:

10 (a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

(b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

15 (c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

20 (d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

25 (e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului;

(g) opțional crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (f) folosind un proces de crioconservare; și

30 (h) administrarea unui dozaj terapeutic eficient din a treia populație de TIL din punga de perfuzie în etapa (g) la pacient.

Populația terapeutică de TIL recoltată în etapa (e) poate cuprinde suficiente TIL pentru administrarea unui dozaj terapeutic eficient al TIL în etapa (h).

35 Numărul de TIL suficient for administrarea unui dozaj terapeutic eficient în etapa (h) poate fi de la circa 2.3×10^{10} până la circa 13.7×10^{10} .

Celulele de prezentare a antigenului (APC) pot fi PBMC.

PBMC pot fi adăugate în cultura celulară în oricare dintre zilele 9 - 14 în etapa (d).

Înainte administrării unui dozaj terapeutic eficient de celule TIL în etapa (h), poate să fi fost administrat la pacient un regim de limfodepleție non-mieloablative.

40 Regimul de limfodepleție non-mieloablative poate cuprinde etapele de administrare a ciclofosfamidei la o doză de 60 mg/m²/zi timp de două zile, urmată de administrarea fludarabinei la o doză de 25 mg/m²/zi timp de cinci zile.

Metoda mai poate cuprinde etapa de tratare a pacientului cu un regim IL-2 în doză mare începând cu ziua de după administrarea celulelor TIL la pacient în etapa (h).

45 Regimul IL-2 în doză mare poate cuprinde 600.000 sau 720.000 IU/kg administrat ca o perfuzie intravenoasă în bolus în 15 minute din opt în opt ore până la toleranță.

A treia populație de TIL în etapa (d) poate fi o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală din populația terapeutică de TIL prezintă una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

50 Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală din populația terapeutică de TIL pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

55 Cancerul poate fi selectat din grupul constând din melanom, cancer ovarian, cancer de col uterin, cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer pulmonar, cancer de vezică, cancer mamar, cancer cauzat de papilomavirus uman, cancer la cap și gât (inclusiv carcinom celular scuamos la cap și gât (HNSCC)), cancer renal și carcinom cu celule renale.

Cancerul poate fi selectat din grupul constând din melanom, HNSCC, cancer de col uterins și NSCLC.

Cancerul poate fi melanom.

Cancerul poate fi HNSCC.

5 Cancerul poate fi un cancer de col uterin.

Cancerul poate fi NSCLC.

Se divulgă de asemenea în prezenta, dar nu este revendica, metode de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) într-o populație terapeutică de TIL cuprinzând:

10 (a) adăugarea fragmentelor tumorale procesate dintr-o tumoare rezecată de la un pacient într-un sistem închis pentru a obține o primă populație de TIL;

(b) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (a) la etapa (b) are loc fără deschiderea sistemului;

15 (c) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

20 (d) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (c), unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului; și

25 (e) transferul populației TIL recoltate de la etapa (d) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (d) la (e) are loc fără deschiderea sistemului

Populația terapeutică de TIL recoltată în etapa (d) poate cuprinde suficiente TIL pentru un dozaj terapeutic eficient al TIL.

30 Numărul de TIL suficient pentru un dozaj terapeutic eficient este de la circa 2.3×10^{10} până la circa 13.7×10^{10} .

Metoda mai poate cuprinde etapa de crioconservare a pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată folosind un proces de crioconservare.

35 Procesul de crioconservare poate fi efectuează folosind un raport 1:1 între populația TIL recoltată și mediul de crioconservare.

Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule mononucleare din sângele periferic (PBMC).

PBMC pot fi iradiate și alogenice.

PBMC pot fi adăugate în cultura celulară în oricare dintre zilele 9 până la 14 în etapa (c).

40 Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule de prezentare a antigenului.

Recoltarea din etapa (d) poate fi efectuează folosind un sistem de procesare celulară LOVO.

Fragmentele multiple pot cuprind circa 4 până la circa 50 fragmente, unde fiecare fragment are un volum de circa 27 mm^3 .

Fragmentele multiple pot cuprind circa 30 până la circa 60 fragmente cu un volum total de circa 1300 mm^3 până la circa 1500 mm^3 .

45 Fragmentele multiple pot cuprind circa 50 fragmente cu un volum total de circa 1350 mm^3 .

Fragmentele multiple pot cuprind circa 50 fragmente cu o masă totală de circa 1 gram până la circa 1.5 grame.

Fragmentele multiple pot cuprind circa 4 fragmente.

50 Al doilea mediu de cultură celulară poate fi prevăzut într-un recipient selectat din grupul constând dintr-un recipient G și o pungă celulară Xuri.

Punga de perfuzie în etapa (e) poate fi o pungă de perfuzie conținând HypoThermosol.

Prima perioadă în etapa (b) și a doua perioadă în etapa (c) pot fi efectuate individual într-o perioadă de 10 zile, 11 zile sau 12 zile.

55 Prima perioadă în etapa (b) și a doua perioadă în etapa (c) pot fi efectuate fiecare individual într-o perioadă de 11 zile.

Etapele (a) până la (e) pot fi efectuează într-o perioadă de circa 10 zile până la circa 22 zile.

Etapele (a) până la (e) pot fi efectuează într-o perioadă de circa 10 zile până la circa 20 zile.

Etapele (a) până la (e) pot fi efectuează într-o perioadă de circa 10 zile până la circa 15 zile.

Etapele (a) până la (e) pot fi efectuează în 22 zile sau mai puțin.

Etapela (a) până la (e) și crioconservarea pot fi efectuate în 22 zile sau mai puțin.

Etapela (b) până la (e) pot fi efectuate într-un singur recipient, unde efectuarea etapelor (b) până la (e) într-un singur recipient duce la o creștere a producției TIL per tumoare rezecată față de efectuarea etapelor (b) până la (e) în mai multe recipiente.

5 Celulele de prezentare a antigenului pot fi adăugate în TIL în a doua perioadă în etapa (c) fără deschiderea sistemului.

A treia populație de TIL în etapa (d) poate fi o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute în populația terapeutică de TIL prezintă una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

10 Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute în populația terapeutică de TIL pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Riscul de contaminare microbiană poate fi redus față de un sistem deschis.

TIL de la etapa (e) pot fi infuzate într-un pacient.

Recipientul închis poate cuprinde un singur bioreactor.

Recipientul închis poate cuprinde un G-REX-10.

20 Recipientul închis poate cuprinde un G-REX-100.

La etapa (d) celulele de prezentare a antigenului (APC) pot fi adăugate în cultura celulară a celei de-a doua populații de TIL la un raport APC:TIL de 25:1 până la 100:1.

Cultura celulară poate avea un raport de 2.5×10^9 APC la 100×10^6 TIL.

25 La etapa (c) celulele de prezentare a antigenului (APC) pot fi adăugate în cultura celulară a celei de-a doua populații de TIL la un raport APC:TIL de 25:1 până la 100:1.

Cultura celulară poate avea un raport de 2.5×10^9 APC la 100×10^6 TIL.

Se divulgă de asemenea în prezenta, dar fără a se revendica, o populație de TIL amplificate pentru utilizare în tratarea unui subiect cu cancer, unde populația de TIL amplificate este o a treia populație de TIL obținută printr-o metodă cuprinzând:

30 (a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

(b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

35 (c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

40 (d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

45 (e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului; și

50 (g) opțional crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (f) folosind un proces de crioconservare.

Populația de TIL poate fi utilizată pentru tratarea unui subiect cu cancer conform metodelor descrise mai sus și în prezenta, unde metoda mai cuprinde una sau mai multe dintre caracteristicile indicate mai sus și în prezenta.

55 SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1: reprezintă o diagramă a unei aplicări a procesului 2A, un proces de 22 de zile pentru fabricarea TIL.

Figura 2: reprezintă o comparație între procesul 1C și o aplicare a procesului 2A de fabricare TIL.

Figura 3: reprezintă cronologia procesului 1C.

Figura 4: reprezintă procesul dintr-o aplicare a terapiei TIL folosind procesul 2A de fabricare TIL, inclusiv etapele de administrare și co-terapie, pentru un număr de celule mai mare.

5 **Figura 5:** reprezintă procesul dintr-o aplicare a terapiei TIL folosind procesul 2A de fabricare TIL, inclusiv etapele de administrare și co-terapie, pentru un număr de celule mai mic.

Figura 6: reprezintă o schemă detaliată a unei aplicări a procesului 2A.

Figura 7: reprezintă caracterizarea TIL preparate folosind o aplicare a procesului 2A comparând expresia interferon-gamma (IFN- γ) între TIL proaspete și TIL decongelate.

10 **Figura 8:** reprezintă caracterizarea TIL preparate folosind o aplicare a procesului 2A examinând expresia CD3 în TIL proaspete versus TIL decongelate.

Figura 9: reprezintă caracterizarea TIL preparate folosind o aplicare a procesului 2A examinând recuperarea în TIL proaspete versus TIL decongelate.

Figura 10: reprezintă caracterizarea TIL preparate folosind o aplicare a procesului 2A examinând viabilitatea TIL proaspete versus TIL decongelate.

15 **Figura 11:** indică etapele majore ale unei aplicări a procesului 2A incluzând etapele de crioconservare.

Figura 12: indică numărul celulelor obținute din procesul 1C și o variantă de realizare a procedurii 2A.

20 **Figura 13:** indică viabilitatea procentuală a celulelor obținute din procesul 1C și o aplicare a procesului 2A.

Figura 14: indică procentajele celulelor CD45 și CD3 (i.e., celule T) măsurate prin citometrie în flux pentru TIL obținute în procesul 1C și o aplicare a procesului 2A.

Figura 15: indică eliberarea IFN- γ obținută pentru procesul 1C și aplicările procesului 2A, măsurată printr-un test diferit de cel folosit pentru generarea datelor din Figurile 80 și 98.

25 **Figura 16:** indică eliberarea IFN- γ obținută pentru procesul 1C și aplicările procesului 2A, măsurată printr-un test diferit de cel folosit pentru generarea datelor din Figurile 80 și 98.

Figura 17: indică procentajele celulelor TCR a/b și NK obținute din procesul 1C și o aplicare a procesului 2A.

30 **Figura 18:** indică procentajele celulelor CD8⁺ și CD4⁺ măsurate prin citometrie în flux pentru TIL obținute în procesul 1C și o aplicare a procesului 2A, precum și raportul dintre fiecare subset.

Figura 19: indică procentajele subseturilor de memorie măsurate prin citometrie în flux pentru TIL obținute din procesul 1C și o aplicare a procesului 2A.

Figura 20: indică procentajele expresiei PD-1, LAG-3 și TIM-3 prin citometrie în flux pentru TIL obținute din procesul 1C și o aplicare a procesului 2A.

35 **Figura 21:** indică procentajele expresiei 4-1BB, CD69 și KLRG1 prin citometrie în flux pentru TIL obținute din procesul 1C și o aplicare a procesului 2A.

Figura 22: indică procentajele expresiei TIGIT prin citometrie în flux pentru TIL obținute din procesul 1C și o aplicare a procesului 2A.

40 **Figura 23:** indică procentajele expresiei CD27 și CD28 prin citometrie în flux pentru TIL obținute din procesul 1C și o aplicare a procesului 2A.

Figura 24: indică rezultatele analizei lungimii telomerilor flow-FISH.

Figura 25: indică rezultatele analizei lungimii telomerilor flow-FISH (după îndepărtarea unui punct de date cu deviație extremă).

45 **Figura 26:** indică planului testului clinic incluzând grupuri tratate cu procesul 1C și o aplicare a procesului 2A.

Figura 27: graficul procesului exemplificativ 2A prezentând etapele A - F.

Figura 28: schema procesului 2A.

Figura 29: schema planului de colectare a datelor procesului 2A

Figura 30: viabilitatea TIL proaspete vs. decongelate

50 **Figura 31:** expansiunea TIL proaspete și decongelate în cultură re-REP

Figura 32: valori de laborator normale ale metaboliților în sânge.

Figura 33: analiza metaboliților TIL pre-REP din procesul 2A.

Figura 34: cuantificarea IL-2 cultura celulară TIL pre-REP din procesul 2A.

55 **Figura 35:** eliberarea citokinelor citotoxice IFN- γ la stimulare cu anti-CD3, anti-CD28 și anti-4-1BB a TIL.

Figura 36: eliberarea granzimei B după stimulare anti-CD3, anti-CD28 și anti-4-1BB a TIL.

Figura 37: TCR $\alpha\beta$ + TIL. Majoritatea celulelor T CD3+ umane exprimă receptorii formați de lanțurile α și β care recunosc antigene într-o manieră restricționată de MHC. A) Cu excepția M1061, produsul TIL proaspete și decongelate a avut 80% sau mai multe TIL care exprimă TCR $\alpha\beta$ +. Atât TIL

proaspete, cât și decongelate au avut expresie comparabilă a TCR $\alpha\beta$ (valoarea-p - 0.9582). Chiar dacă s-a observat o scădere a TIL care exprimă TCR $\alpha\beta$ după Re-REP, această scădere nu a fost semnificativă în TIL Re-REP ($p = 0.24$). B) A existat o scădere de 9.2% și 15.7% a TIL RE-REP proaspete și decongelate care exprimă TCR $\alpha\beta$ în comparație cu TIL proaspete și decongelate.

5 **Figura 38:** TCR $\alpha\beta$ -CD56+. Celulele Natural Killer infiltrante în tumori (NK) și NKT au de asemenea capacitatea de a liza celule fără expresie MHC, precum și antigen lipidic prezentat de CD1 și și de a furniza citokine imunoregulatorie. Totuși, o infiltrare celulară NK intensă este asociată cu boală avansată și ar putea facilita dezvoltarea cancerului. Figura A arată că, în toate cazurile, cu excepția M1063, a existat o scădere modestă, ne semnificativă, a populației NK în TIL decongelate comparativ cu TIL proaspete, ($p = 0.27$). Nu s-a observat diferență semnificativă între populația TIL re-REP ($p = 0.88$). TIL proaspete, TIL re-REP proaspete și TIL re-REP decongelate demonstrează expresie similară a CD56 așa cum se indică în Figura B. Produsul TIL decongelate a avut mai puține (1.9 ± 1.3) celule care exprimă NK decât TIL proaspete (3.0 ± 2.2) posibil ca rezultat al procedurii de criocongelare.

10 **Figura 39:** Celule CD4+. Nu s-a observat diferență substanțială în populația CD4 în condiții individuale. Figura A indică populația CD4 medie în fiecare condiție. Tabelul din Figura B indică valorile SD și SEM. Există o ușoară scădere a populației CD4 în populația re-REP proaspătă, cauzată în cea mai mare parte de o scădere a CD4 în populația re-REP proaspătă în EP11001T.

15 **Figura 40:** Celule CD8+. A) În toate situațiile, cu excepția EP11001T, atât TIL proaspete, cât și decongelate au prezentat populații CD8+ comparabile ($p=0.10$, fără diferență semnificativă). În majoritatea experimentelor, a existat o ușoară scădere a TIL care exprimă CD8+ în TIL re-REP proaspete (excepțiile au fost M1061T și M1065T). A existat o scădere de aproximativ 10-30% în populația CD8+ în TIL re-REP decongelate. Compararea TIL re-REP din TIL proaspete și decongelate a prezentat o diferență semnificativă ($p = 0.03$, test t Student). Figura B indică valorile medii ale TIL care exprimă CD8+ în toate condițiile. TIL proaspete și decongelate prezintă rezultate similare. A existat însă o scădere de 10.8% în populația CD8+ în TIL re-REP decongelate în comparație cu TIL re-REP proaspete.

20 **Figura 41:** Celule CD4+CD154+. CD154, cunoscut și ca CD40L, este un marker pentru celule T activate. Figura A: Nu s-a observat diferență substanțială în populația CD4+CD154+ în diferitele condiții, dar s-a observat o scădere de 34.1% în TIL CD4+ re-REP proaspete EP11001T. Expresia CD154 nu s-a măsurat în M1061T și M1062T fiindcă aceste experimente s-au efectuat înaintea stabilirii grupului extins al fenotipurilor. Figura B: O ușoară scădere a condiției TIL decongelate ar putea fi atribuită nemăsurării CD154 în M1061T și M1062T. Toate condițiile indică expresie CD154 foarte comparabilă în populația CD4, sugerând celule T CD4+ activate.

25 **Figura 42A-42B:** Celule CD8+CD154+. S-a analizat și markerul de activare CD154 exprimat pe TIL CD8+. A) În general, expresia CD154 a fost mai mică în populația CD8+ în TIL proaspete și decongelate. Acest lucru nu este surprinzător fiindcă CD154 este exprimat în principal în celule T CD4+ activate. În cazurile în care expresia CD154 s-a măsurat atât în TIL proaspete, cât și decongelate, fie nu s-a observat nici o diferență, fie s-a observat o creștere a expresiei CD154 în TIL decongelate. Testul t Student a arătat că nu există diferență semnificativă între cele două condiții. A existat o creștere a expresiei CD154 în re-REP decongelat în comparație cu re-REP proaspăt în toate experimentele ($p = 0.02$). B) S-a observat o creștere a expresiei CD154 atât în TIL decongelate, cât și TIL re-REP decongelate în comparație cu omologii lor. TIL re-REP decongelate au prezentat o creștere de 29.1% a expresiei CD154 față de TIL re-REP proaspete.

30 **Figura 43A-43B:** Celule CD4+CD69+. CD69 este markerul de activare timpuriu în celule T în urma stimulării sau activării. A) În toate TIL, cu excepția EP11001T, re-REP atât proaspete, cât și decongelate au prezentat o creștere modestă a expresiei CD69, posibil pe baza lungimii re-REP (7 zile în loc de 11 zile). Nu s-a observat nici o diferență între TIL proaspete și decongelate ($p = 0.89$). Nu s-a observat nici o diferență nici între re-REP proaspete și decongelate ($p = 0.82$). B) Se observă o creștere minoră a expresiei CD69 în producția TIL re-REP. (Obs.: nu s-a efectuat colorare CD69 pentru TIL decongelate M1061T și M1062T. Expresia CD69 a produșilor TIL proaspete M1061T a fost 33.9%).

35 **Figura 44A-44B:** Celule CD8+CD69+. Așa cum s-a observat pentru populația CD4+, Figura A indică o creștere a expresiei CD69 în TIL re-REP CD8+. Expresia CD69 nu a prezentat nici o diferență semnificativă între TIL proaspete și decongelate ($p = 0.68$) sau TIL re-REP proaspete și decongelate ($p = 0.76$). Figura B susține observația că există o creștere modestă a expresiei CD69 în produsul TIL re-REP product.

40 **Figura 45A-45B:** Celule CD4+CD137+. CD137 (4-11313) este un receptor costimulator T celular indus la activarea TCR. Este activat pe celule T CD4+ și CD8+. A) Expresia CD137 a prezentat o creștere profundă a populației TIL re-REP după 7 zile de stimulare. Nu s-a observat însă diferență între TIL proaspete și decongelate sau TIL re-REP proaspete și decongelate ($p < 0.05$ în ambele vazuri, Figura B susține această observație). De asemenea, TIL decongelate au prezentat o scădere modestă a expresiei

55

CD137. Creșterea expresiei CD137 în TIL re-REP poate fi atribuită celei de-a doua runde de stimulare a re-REP de 7 zile.

Figura 46A-46B: Celule CD8+CD137+. A) Populația CD8+ a prezentat o creștere generală a produsului re-REP. B) Produsul re-REP proaspăt a prezentat o creștere de 33.4% a expresiei CD8+CD137+ în comparație cu TIL proaspete. Produsul re-REP decongelat a prezentat de asemenea o creștere de 33.15% a expresiei CD137 în populația CD8+ comparativ cu TIL decongelate. Nu s-au observat diferențe semnificative între TIL re-REP proaspete și decongelate. Se poate vedea o observație similară comparând TIL proaspete cu TIL decongelate. Această creștere a expresiei CD137 poate fi atribuită celei de-a doua runde de activare a re-REP. (Se observă că s-au folosit numai 6 TIL pentru analiză, expresia CD137 nefiind măsurată pentru 3 dintre experimente).

Figura 47A-47B: Celule CD4+CM. Populația de memorie centrală (CM) este definită de expresie CD45RA- (negativă) și CCR7+ (pozitivă). A) S-a observat o creștere a populației CM în condițiile re-REP. M1063T și M1064T au prezentat o scădere a expresiei CM în populația CD4+ obținută din TIL decongelate în comparație cu TIL proaspete. Nici TIL proaspete și decongelate ($p = 0.1658$), nici re-REP proaspăt și TIL re-REP decongelate ($p = 0.5535$) nu au prezentat o diferență semnificativă a populației CM. B) S-a observat o creștere de 14.4% și 15.4% a populației CM în TIL re-REP proaspete și decongelate în comparație cu TIL proaspete și decongelate.

Figura 48A-48B: Celule CD8+CM. A) În populația CD8+, s-a observat o creștere dramatică a expresiei CM în TIL proaspete, o observație care nu este prezentă în produsul TIL. Această creștere nu a afectat semnificația ($p = 0.3086$), sugerând că nu există diferență între TIL proaspete și decongelate. S-a observat o tendință similară și în produșii TIL re-REP. Figura 48B) S-a observat o creștere generală a populației CM în TIL proaspete în comparație cu TIL decongelate. Numărul arată că TIL proaspete și TIL re-REP au avut o diferență de numai -2%; TIL proaspete au prezentat o abatere standard foarte mare, care ar putea fi atribuită M1064T; excluderea expresiei CM în M1064T a dus la expresie CM foarte similară între produșii TIL proaspete și decongelate (nereprezentat).

Figura 49A-49B: Celule CD4+EM. Populația de memorie efectoare (EM) este definită de lipsa expresiei CCR7 și CD45RA. A) După cum s-a anticipat, populația CD4+ din TIL proaspete și decongelate a avut un nivel ridicat de fenotip de memorie efectoare. S-a determinat o scădere drastică a expresiei memoriei efectoare în populația M1056T TIL re-REP. De asemenea, alte 5 experimente au indicat o scădere a fenotipului de memorie efectoare în TIL re-REP atât proaspete, cât și decongelate. B) Ambele TIL proaspete și decongelate au prezentat expresie similară a fenotipului de memorie efectoare. Compararea TIL proaspete și TIL re-REP proaspete a indicat o scădere de 16% în cele din urmă. S-a observat o scădere similară în TIL re-REP decongelate (9%) comparate cu TIL decongelate.

Figura 50A-50B: Celule CD8+EM. A) Un tipar similar de memorie efectoare mărită în TIL proaspete s-a observat și în populația CD8+. S-a observat o excepție în M1064T, unde TIL proaspete au avut un profil de memorie efectoare de numai 20%; acesta se poate atribui faptului că 73% din aceste TIL au un fenotip CM descris în A și B. Toate probele care prezintă o scădere a populației de memorie efectoare în TIL CD4+ din produsul re-REP au urmat aceeași tendință în TIL CD8+. B) Spre deosebire de populația TIL CD4+, TIL CD8+ au prezentat un fenotip de memorie efectoare similar în produși proaspeți, decongețați și re-REP. (Se observă abatere standard mare în TIL proaspete și decongelate, atribuibilă populației de memorie efectoare mici în M1064T proaspete și lipsei expresiei în probe TIL M1061T decongelate).

Figura 51A-51B: Celule CD4+CD28+. Expresia CD28 se corelează cu TIL tinere, scăzând odată cu vârsta. A) Chiar dacă s-a observat o creștere a populației CM în TIL re-REP, s-a observat o scădere a expresiei CD28 ca o tendință sugerând că doar starea CM nu a putut determina soarta TIL. S-a observat o scădere a expresiei CD28 în produsul re-REP, cu excepția TIL CD4+ M1061T. B) S-a observat o scădere de 8.89% în TIL proaspete și 5.71% în TIL decongelate comparativ cu produșii TIL proaspeți și decongețați.

Figura 52A-52B: Celule CD8+CD28+. A) Expresia CD28 în populația CD8+ TIL a fost mai mare în TIL proaspete și decongelate decât produsul re-REP. În majoritatea cazurilor, TIL re-REP decongelate au prezentat o scădere drastică față de TIL decongelate și TIL re-REP proaspete. Totuși, testul t Student nu a indicat nici o diferență semnificativă între TIL proaspete și decongelate ($p = 0.3668$), precum și între produși re-REP proaspeți și decongețați ($p = 0.7940$). B) Așa cum s-a observat în populația TIL CD4+, a existat o scădere a populației CD8+CD28+ în re-REP proaspete (21.5%) și re-REP decongelate (18.2%) comparativ cu omologii lor nerestimulați.

Figura 53A-53B: Celule CD4+PD-1+. Expresia PD-1 în TIL este corelată cu celule T reactive la antigen și epuizate. Prin urmare nu este surprinzător că se observă un fenotip epuizat în TIL care au suferit REP 11 zile. A) Acest fenotip epuizat s-a menținut sau a crescut (în mod specific, EP11001T și M1056T) în produsul TIL decongelat. Nu s-a observat diferență semnificativă între produsul TIL proaspete și decongelate ($p = 0.9809$). A existat o tendință similară în TIL re-REP proaspete comparativ cu cele

decongelate ($p = 0.0912$). B) re-REP proaspăt a prezentat o scădere modestă a expresiei PD-1 în populația CD4+ TIL. Toate celelalte condiții au menținut un tipar de expresie PD-1 comparabil. S-a observat o scădere sau nici o modificare a expresiei PD-1 în produsul re-REP proaspăt comparativ cu toate celelalte condiții. S-a observat o creștere a expresiei PD-1 în M1062T, M1063T (CD4+) și EP11001T (CD8+) în produsul re-REP decongelat. Toți ceilalți produși re-REP decongealați au prezentat rezultate comparabile cu produsul dezghețat.

Figura 54A-54B: Celule CD8+PD-1+. A) Populația CD8+ din TIL proaspete a prezentat un fenotip mai epuizat asociat cu expresie PD-1 mărită. O excepție s-a observat în EP11001T, unde TIL CD8+ decongelate au prezentat o creștere modestă a expresiei PD-1 comparativ cu TIL proaspete. A existat o diferență mică, dar nesemnificativă, a expresiei PD-1 în TIL proaspete comparativ cu TIL decongelate ($p = 0.3144$). B) TIL proaspete au prezentat o ușoară creștere, dar nesemnificativă, a expresiei PD-1 comparativ cu TIL decongelate (6.74% sau de 1.2 ori mai mare decât TIL decongelate), sugerând că TIL decongelate au fost comparabile pe baza tiparului fenotipului.

Figura 55A-55B: Celule CD4+LAG3+. Celulele T epuizate exprimă niveluri mari de receptor inhibitor LAG3 împreună cu PD-1. A) TIL CD4+ decongelate au prezentat niveluri ușor mai mari, dar nesemnificative, ale expresiei LAG3 în comparație cu TIL proaspete ($p = 0.52$). O excepție a fost observată în M1063T. În experimentele în care s-a măsurat expresia LAG3 în TIL CD4+ proaspete și TIL re-REP proaspete, s-a observat o scădere a expresiei LAG3+ în probele re-REP proaspete comparativ cu TIL proaspete. B) În general, există o scădere modestă a expresiei LAG3 în TIL re-REP proaspete. Se menționează că pentru menținerea consecvenței Figurii B, M1061T, M1062T și M1064T s-au exclus fiindcă expresia LAG3 nu a fost măsurată în produs proaspăt.

Figura 56A-56B: Celule CD8+LAG3+. A) TIL care exprimă CD8+ LAG3+ au prezentat o scădere modestă în experimente, cu excepția M1063T, în care s-a observat o scădere pronunțată a expresiei LAG3 în TIL re-REP proaspete. În general, TIL re-REP decongelate au prezentat o creștere semnificativă de 1.5 ori comparativ cu TIL re-REP proaspete pentru expresia LAG3 ($p = 0.0154$). Nu s-a observat însă diferență semnificativă între TIL proaspete și TIL decongelate ($p = 0.0884$). B) S-a observat o scădere aproximativă de 30% a expresiei LAG3 în TIL CD8+ din re-REP proaspăt în comparație cu TIL decongelate. TIL atât proaspete, cât și decongelate au fost comparabile cu TIL decongelate prezentând o creștere modestă. (În această figură, M1061T, M1062T și M1064T au fost omise fiindcă expresia LAG3 nu s-a măsurat în probele TIL proaspete sau re-REP proaspete).

Figura 57A-57B: Celule CD4+TIM-3+. A) După cum s-a observat anterior în cazul PD-1 și LAG3, s-a observat o scădere a expresiei TIM-3 în TIL re-REP proaspete comparativ cu TIL re-REP decongelate. Nu a existat însă nici o diferență semnificativă între TIL re-REP proaspete și decongelate ($p = 0.2007$). B) Nu s-au observat modificări majore ale expresiei TIM-3 între produși TIL re-REP proaspete și decongealați. S-a observat o scădere modestă de 9.2% a expresiei TIM-3 în TIL re-REP proaspete în comparație cu produsul re-REP decongelat.

Figura 58A-58B: Celule CD8+TIM-3+. A) O tendință similară a expresiei TIM-3 observată în populația CD4+ a fost observată și în TIL CD8+. TIL re-REP proaspete au avut cel mai mic fenotip epuizat cu expresie TIM-3 mică, indicând o diferență semnificativă în comparație cu TIL re-REP decongelate ($p = 0.0147$). Compararea PD-1, LAG3 și TIM-3 sugerează că TIL re-REP proaspete au avut un fenotip epuizat mai mic cu fenotip CM mărit. B) În comparație cu TIL re-REP decongelate, TIL re-REP proaspete au prezentat o scădere semnificativă de 22% a expresiei TIM-3. TIL proaspete și decongelate prezintă tipare de expresie TIM-3 similare.

Figura 59: Potențialul citotoxic al TIL împotriva liniei celulare țintă P815.

Figura 60A-60F: Profilul respirator metabolic al TIL proaspete, TIL re-REP proaspete și TIL re-REP decongelate. OCR de bază (A), SRC clar (B), SRC2DG (C), SRC ascuns (D), ECAR de bază (E) și rezerva glicolitică (F).

Figura 61A-61B: S-a folosit tehnologia Flow-FISH pentru a măsura lungimea medie a repetiției telomerice în 9 TIL decongelate din procesul 2A post-REP. A) Datele reprezintă lungimea telomerilor măsurată prin qPCR comparând TIL cu celule 1301 B) Datele reprezintă lungimea telomerilor măsurată prin Flow Fish a TIL comparativ cu celule 1301. Datele folosite pentru grafice sunt prevăzute în format de tabel (Tabel 25) în secțiunea 10. În general, a existat o asemănare aproximativă în tiparele rezultatelor celor două teste de lungime a telomerilor, dar experimentele vor continua să determine care metodă reflectă mai exact lungimea reală a telomerilor TIL. Această tehnică se poate aplica probelor clinice viitoare pentru a determina un raport între lungimea telomerilor și răspunsul pacienților la terapie TIL.

Figura 62A-62B: Selecția furnizorului de mediu fără ser (înlocuitor de ser). Fiecare fragment s-a cultivat într-un godeu al plăcii G-Rex cu 24 de godeuri în cvadruplicat. În ziua 11, REP s-au inițiat folosind 4^5 TIL cu 10^6 feeder pentru a imita procesul 2A. A) Histogramă care indică numărul mediu al celulelor viabile înregistrat în ziua 11 (preREP) pentru fiecare condiție. B) Histogramă care indică numărul mediu al

celulelor viabile înregistrat în ziua 22 (postREP). Valoarea P s-a calculat folosind testul 't' student. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

Figura 63A-63B: Selecția furnizorului de mediu fără ser (ser lizat trombocitar). Fiecare fragment s-a cultivat într-un godeu al plăcii G-Rex cu 24 de godeuri în triplicat. În ziua 11, REP s-au inițiat folosind 4e5 TIL cu 10e6 feeder pentru a imita procesul 2A. A) Histogramă care indică numărul mediu al celulelor viabile înregistrat în ziua 11 (preREP) pentru fiecare condiție. B) Histogramă care indică numărul mediu al celulelor viabile înregistrat în ziua 22 (postREP). Valoarea P s-a calculat folosind testul 't' student. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. #fragmente tumorale insuficiente.

Figura 64A-64B: Compararea eficienței CTS Optimizer cu condiție standard folosind procesul 2A la mini-scară (G-Rex 5M). Două fragmente / G-Rex 5M s-au cultivat în triplicat, REP s-au inițiat folosind 2⁶ TIL cu 50⁶ feeder pentru a imita procesul 2A. Barele prezentate mai sus au reprezentat numărul mediu de celule viabile obținut în ziua 11 (A) sau ziua 22 (B).

Figura 65A-65C: Rezumatul pre și post expansiune TIL extrapolate, comparând condiția standard și CTS Optimizer. A) PreREP. B) PostREP. C) Rezumatul expansiunii TIL extrapolate la scară totală (Standard vs CTS Optimizer +SR).

Figura 66: CD8+ a fost activat pe celule vii. 7 din 9 tumori prezintă o creștere în populații CD8+ absolute cu condiția CTS+SR.

Figura 67: Comparabilitatea interferon-gamma. Interferon-gamma ELISA (Quantikine). Producția IFN- γ s-a măsurat folosind kitul Quantikine ELISA de la R&D systems. CTS+SR a produs cantități comparabile de IFN- γ comparativ cu condiția noastră standard.

Figura 68: Schema unei aplicări exemplificative a Protocolului de expansiune rapidă (REP). La sosire, tumoarea este fragmentată, așezată în baloane G-Rex cu IL-2 pentru expansiune TIL (expansiune pre-REP), 11 zile. Pentru studiile cu amestec triplu, IL-2/IL-15/IL-21 se adaugă la inițierea pre-REP. Pentru Protocolul de expansiune rapidă (REP), TIL se cultivă cu feeder și OKT3 pentru expansiune REP alte 11 zile.

Figura 69: TIL provenite din melanom (n=4) și plămân (n=7) s-au evaluat fenotipic cu privire la celulele CD4+ și CD8+ folosind citometrie în flux post pre-REP. *Valorile p reprezintă diferența între IL-2 și IL-12/IL-15/IL-21 în celulele CD8+ folosind testul t student neîmperecheat.

Figura 70: TIL provenite din melanom (n=4) și plămân (n=7) s-au evaluat fenotipic cu privire la CD27+ și CD28+ în celulele CD4+ și CD8+ folosind citometrie în flux post pre-REP.

Figura 71A-71B: TIL s-au evaluat fenotipic cu privire la subseturile efectoare/memorie (CD45RA și CCR7) în celulele CD8+ și CD4+ (date nereprezentate) în melanom (n=4) (A) și plămân (n=8) (B). Expresia CXCR3 s-a folosit în melanom și plămân. Întreaga expresie fenotipică s-a evaluat folosind citometrie în flux post pre-REP. TCM=memorie centrală, TSCM=memorie celule stem, TEMRA (celule T efectoare), TEM=memorie efectoare.

Figura 72A-72C: TIL provenite din (A) melanom (n=4) și (B) plămân (n=5) s-au evaluat cu privire la expresia CD107a+ în răspuns la stimulare PMA 4 ore în celule CD4+ și CD8+, prin citometrie în flux. (C) TIL pre-REP (n=5) au fost stimulate 24 ore cu OKT3 solubil (30ng/ml) și supernatanții s-au evaluat cu privire la IPN γ prin ELISA.

Figura 73A-73B: Repertoriul TCR $\nu\beta$ (24 specificități) s-a evaluat în TIL din melanom (A) și plămân (B) folosind kitul Beckman Coulter pentru citometrie în flux.

Figura 74: Proces exemplificativ de producție a TIL crioconservate (-22 zile).

Figura 75A-75B: În ziua 22, produsul celular redus în volum este colectat și se prelevează probe pentru a determina performanța culturii înainte de spălare și preparare. Probele se analizează pe aparatul de numărare automat NC-200 așa cum s-a descris anterior. Densitatea totală a celulelor viabile este determinată prin media numărărilor în duplicat din 4 probe independente. Procesul din generația 2 (Gen 2) generează un produs TIL cu doză similară generației 1 (Gen 1; medie Gen 1 = $4.10 \times 10^{10} \pm 2.92 \times 10^{10}$, medie Gen 2 = $3.12 \times 10^{10} \pm 2.19 \times 10^{10}$). B) Gradul de expansiune se calculează pentru faza REP ca deîmpărțit al densității finale a celulelor viabile față de densitatea de însămânțare a TIL viabile inițiale. Producții TIL Gen 2 au o expansiune mai mică față de Gen 1 (medie Gen 1 = $1.40 \times 10^3 \pm 9.86 \times 10^2$, medie Gen 2 = $5.11 \times 10^2 \pm 2.95 \times 10^2$).

Figura 76: Producții medicamentoși preparați proaspeți s-au analizat cu privire la identitate prin citometrie în flux pentru eliberare. Procesele Gen 1 și Gen 2 produc culturi de celule T de puritate mare definite de fenotip dublu pozitiv CD45, CD3 (Gen1 # \pm SD, Gen 2 # \pm SD). Valoarea p s-a calculat folosind testul 't' Mann-Whitney.

Figura 77: Fiolele satelit crioconservate de produs medicamentos preparat s-au decongelat și s-au evaluat cu privire la fenotipul extins prin citometrie în flux așa cum s-a descris anterior. Producții Gen 1 și Gen 2 exprimă raporturi similare de subtipuri T celulare CD8 - CD4. Valoare p s-a calculat folosind testul 't' Mann-Whitney.

Figura 78: Firolele satelit crioconservate de produs medicamentos preparat s-au decongelat și s-au evaluat cu privire la fenotipul extins prin citometrie în flux așa cum s-a descris anterior. Producții Gen 1 și Gen 2 exprimă niveluri similare de molecule costimulatoare CD27 și CD28 pe subseturi de celule T. Valoarea P s-a calculat folosind testul 't' Mann-Whitney. Moleculele costimulatoare cum ar fi CD27 și CD28 sunt necesare pentru a furniza semnalizare secundară și terțiară necesară pentru proliferarea celulelor efectoare la activarea receptorului T celular.

Figura 79: S-a folosit tehnologia Flow-FISH pentru a măsura lungimea medie a repetiției telomerice așa cum s-a descris anterior. Valoarea RTL de mai sus arată că fluorescența telomerică medie per cromozom/genom în Gen 1 (o aplicare a procesului 1C) este $\# \% \pm SD\%$ și Gen 2 este $\# \% \pm SD\%$ din fluorescența telomerică per cromozom/genom în liniile celulare de control (linia celulară leucemică 1301). Datele arată că producții Gen 2 în medie au lungime a telomerilor cel puțin comparabilă cu producții Gen 1. Lungimea telomerilor este o măsurare surogat a duratei culturii celulare *ex vivo*.

Figura 80: Producții medicamentoși Gen 2 (o aplicare a procesului 2A) prezintă capacitate crescută de producere IFN- γ față de producții Gen 1. Capacitatea produsului medicamentos de reactivare și de secreție a citokinelor este o măsură surogat a funcției in-vivo la legare TCR de antigenul asociat în contextul HLA.

Figura 81: Diversitatea receptorilor T celulari: ARN din 10×10^6 TIL din Gen 1 (o aplicare a procesului 1C) și Gen 2 (o aplicare a procesului 2A) s-au analizat pentru a determina numărul total și frecvența secvențelor CDR3 unice prezente în fiecare produs. A) Numărul total al secvențelor CDR3 unice prezente în fiecare produs (Gen 1 n=#, medie \pm SD, Gen 2 n=#, medie \pm SD). B) Secvențele CDR3 unice au fost reprezentate față de frecvență în fiecare produs pentru a produce un punctaj reprezentativ al diversității relative a receptorilor T celulari în produs. Producții TIL din ambele procese sunt alcătuiți din populații policlonale de celule T cu diferite specificități și avidități antigenice. Gama repertoriului celular T total poate indica numărul epitopilor care pot acționa pe celule tumorale.

Figura 82: Reprezintă o diagramă a unei aplicări a procesului 2A, un proces de 22 de zile de fabricare TIL.

Figura 83: Tabel comparativ al Etapelor A - F din aplicările exemplificative ale proceselor 1C și 2A.

Figura 84: Comparație detaliată a unei aplicări a procesului 1C și a unei aplicări a procesului 2A.

Figura 85: Schemă detaliată a unei aplicări a procesului de terapie TIL.

Figurile 86A-86C: Caracterizarea fenotipică a a produșilor TIL folosind un test de citometrie în flux în 10 culori. (A) Procentajul subseturilor de celule T și non-T este definit de CD45⁺CD3⁺ și CD45⁻(non-limfocit)/CD45⁺CD3⁻ (non-T-limfocit). În total, >99% dintre producții TIL testați au constat din celule T (CD45⁺CD3⁺). Se indică o medie a produșilor TIL (n=10). (B) Procentajul a două subseturi de celule T inclusiv CD45⁺CD3⁺CD8⁺ (cerc gol albastru) și CD45⁺CD3⁺CD4⁺ (cerc gol roz). Nu s-a observat nici o diferență statistică în procentajul celor două subseturi folosind testul t student neîmperecheat (P=0.68). (C) Populația de celule non-T a fost caracterizată pentru patru subseturi diferite inclusiv: 1) non-limfocit (CD45⁻), 2) celule NK (CD45⁺CD3⁻CD16⁺/56⁺), 3) celule B (CD45⁺CD19⁺) și 4) non-NKB (CD45⁺CD3⁻CD16⁻CD56⁻CD19⁻).

Figurile 87A-87B: Caracterizarea subseturilor de celule T în populații CD45⁺CD3⁺CD4⁺ și CD45⁺CD3⁺CD8⁺. Subseturile de celule T naive, de memorie centrală (TCM), memorie efectoare (TEF) și memorie efectoare RA⁺(EMRA) s-au definit folosind CD45RA și CCR7. Figurile indică subseturi de celule T reprezentative de la 10 produși TIL finali în populații CD4⁺ (A) și CD8⁺ (B). Subsetul T de memorie efectoare (cerc gol albastru) este o populație majoră (>93%) în ambele subseturi CD4⁺ și CD8⁺ ale produsului final TIL. Mai puțin de 7% dintre producții TIL este subsetul de memorie centrală (cerc gol roz). Subseturile EMRA (cerc gol gri) și naive (cerc gol negru) sunt abia detectate în produsul TIL (<0.02%). Valorile p reprezintă diferența între EM și CM cu test t student neîmperecheat.

Figurile 88A-88B: Detecția expresiei MCSP și EpCAM în celule tumorale de melanom. Liniile celulare tumorale de melanom (WM35, 526 și 888), liniile celulare de melanom obținute de la pacienți (1028, 1032 și 1041) și o linie celulară de adenom colorectal (HT29 ca un control negativ) s-au caracterizat prin colorare pentru markeri MCSP (condroitin sulfat proteoglican asociat cu melanom) și EpCAM (molecula de adeziune celulară epitelială). (A) În medie 90% dintre celulele tumorale de melanom exprimă MCSP. (B) Expresia EpCAM nu a fost detectată în liniile celulare tumorale de melanom comparativ cu control pozitiv HT29, o linie celulară tumorală EpCAM⁺.

Figurile 89A-89B: Detecția controlului pentru determinarea preciziei detecției tumorii. Testul s-a efectuat prin adăugarea unor cantități cunoscute de celule tumorale în suspensii PBMC (n=10). Celulele tumorale de melanom MCSP+526 s-au diluat la raporturi de 1:10, 1:100 și 1:1.000, apoi s-au amestecat cu PBMC și s-au colorat cu anticorpi anti-MCSP și anti-CD45 și colorant pentru celule vii/moarte și s-au analizat prin citometrie în flux. (A) Aproximativ 3000, 300 și 30 celule s-au detectat în diluția de 1:10,

1:100, respectiv 1:1000. (B) S-a folosit o medie (AV) și o abatere standard (SD) de celule din fiecare condiție pentru a defini limitele de referință superioare și inferioare.

Figurile 90A-90B: Studiul de repetabilitate a limitelor superioare și inferioare în control. S-au efectuat trei experimente independente în triplicat pentru a determina repetabilitatea testului. (A) Numărul celulelor tumorale MCSP⁺ detectate s-a încadrat în intervalul limitelor de referință superioare și inferioare. (B) Graficul de regresie liniară demonstrează corelarea între celulele MCSP⁺ și diluările de adăugare ($R^2=0.99$), linia neagră indicând cea mai bună ajustare. Liniile verde și gri întrerupte reprezintă limitele de predicție de 95% în curba standard și probe (Exp#1 - 3).

Figurile 91A-91B: Detecția tumorii de melanom reziduale în producții TIL. Producții TIL au fost evaluați cu privire la contaminarea tumorală reziduală folosind testul dezvoltat (n=15). (A și B) Numărul și procentajul mediu al evenimentelor MCSP⁺ detectabile a fost 2, respectiv 0.0002%.

Figura 92: Evaluarea de potențial al produșilor TIL în urma activării celulelor T. Secreția IFN γ după re-stimulare cu anti-CD3/CD28/CD137 în producții TIL evaluați prin ELISA în duplicat (n=5). Secreția IFN γ de către producții TIL a fost semnificativ mai mare față de controlul nestimulat folosind testul Wilcoxon (P=0.02) și constant >1000 pg/ml. Secreția IFN γ >200 pg/ml se consideră potentă, valoarea p <0.05 este considerată semnificativă statistic.

Figura 93: Reprezentarea unei aplicări a unui proces de preparare TIL crioconservate (22 zile).

Figura 94: Tabelul îmbunătățirilor de produs de la Gen 1 la Gen 2.

Figurile 95A-95C: Celule viabile totale, rata de creștere și viabilitate. În ziua 22 produsul celular redus în volum este colectat și eșantionat pentru a determina performanța culturii înainte de spălare și preparare. (A) probele sunt analizate pe sistemul de numărare automat NC-200 așa cum s-a descris anterior. Densitatea totală a celulelor viabile este determinată de media numărărilor în duplicat din 4 probe independente. Procesul Gen 2 generează un produs TIL cu doză similară cu Gen 1 (medie Gen 1 = $4.10 \times 10^{10} \pm 2.8 \times 10^{10}$, medie Gen 2 = $4.12 \times 10^{10} \pm 2.5 \times 10^{10}$). (B) Rata de creștere se calculează pentru faza REP ca $gr = \ln(N(t)/N(0))/t$. (C) Viabilitatea celulelor s-a evaluat din 9 loturi de dezvoltare a procesului folosind Cellometer K2 așa cum s-a descris anterior. Nu s-a observat scădere semnificativă în viabilitatea celulelor în urma unui singur ciclu de îngheț-dezghet al produsului preparat. Scăderea medie a viabilității la decongelare și eșantionare este 2.19%.

Figurile 96A-96C: Producții Gen 2 sunt culturi de celule T foarte pure care exprimă moleculele costimulatoare la niveluri comparabile cu Gen 1. (A) Producții medicamentoși preparați proaspeți s-au analizat cu privire la identitate prin citometrie în flux pentru eliberare. Procesele Gen 1 și Gen 2 produc culturi de celule T de puritate mare definite de fenotip (dublu pozitiv) CD45+,CD3+. (B & C) Fiolele satelit crioconservate de produs medicamentos preparat s-au decongelat și s-au analizat cu privire la fenotipul extins prin citometrie în flux așa cum s-a descris anterior. Producții Gen 1 și Gen 2 exprimă niveluri similare de molecule costimulatoare CD27 și CD28 pe subseturi de celule T. Moleculele costimulatoare cum ar fi CD27 și CD28 sunt necesare pentru a furniza semnalizare secundară și terțiară necesară pentru proliferarea celulelor efectoare la activarea receptorului T celular. Valoarea p s-a calculat folosind testul 't' Mann-Whitney.

Figura 97: Producții Gen 2 prezintă lungimi similare ale telomerilor. Totuși, unele populații TIL pot tinde către telomer relativ mai lung.

Figura 98: Producții Gen 2 secretă IFN γ în răspuns la activare CD3, CD28 și CD137.

Figurile 99A-99B: Diversitatea receptorilor T celulari. (A) Secvențele CDR3 unice au fost reprezentate față de frecvență în fiecare produs pentru a produce un punctaj reprezentativ pentru diversitatea totală a receptorilor T celulari în produs. (B) Numărul mediu total al secvențelor CDR3 unice prezente în fiecare produs.

Figura 100: O aplicare unui proces de preparare TIL din prezenta invenție.

Figura 101: Creșterea expansiunii în timpul pre-REP cu IL-2/IL-15/IL-21 în histologii tumorale multiple.

Figurile 102A-102B: IL-2/IL-15/IL-21 a mărit procentajul celulelor CD8+ în carcinom pulmonar, dar nu în melanom. TIL din (A) melanom (n=4) și (B) plămân (n=7) s-au evaluat fenotipic cu privire la celulele CD4+ și CD8+ folosind citometrie în flux post pre-REP.

Figurile 103A-103B: Expresia CD27 a fost ușor crescută în celule CD8+ în culturi tratate cu IL-2/IL-15/IL-21. TIL din (A) melanom (n=4) și (B) plămân (n=7) s-au evaluat fenotipic cu privire la CD27+ și CD28+ în celulele CD4+ și CD8+ folosind citometrie în flux post pre-REP.

Figurile 104A-104B: Subseturile de celule T au fost nemodificate cu adăugarea IL-15/IL-21. TIL s-au evaluat fenotipic cu privire la subseturile de celule efectoare/de memorie (CD45RA și CCR7) în celulele CD8+ și CD4+ (date nereprezentate) din (A) melanom (n=4) și (B) plămân (n=8) prin citometrie în flux post pre-REP.

Figurile 105A-105C: Capacitatea funcțională a TIL a fost mărită diferențiat cu IL-2/IL-15/IL-21. TIL din (A) melanom (n=4) și (B) plămân (n=5) s-au evaluat cu privire la expresia CD107a+ în răspuns la stimulare PMA 4 ore în celulele CD4+ și CD8+ prin citometrie în flux. (C) TIL pre-REP derivate din melanom și plămân au fost stimulate 24 ore cu anticorp anti-CD3 solubil și supernatanții s-au evaluat cu privire la IFN γ prin ELISA.

Figurile 106A-106B: Repertoriul TCR $\nu\beta$ (24 specificități) s-a evaluat în TIL derivate din (A) melanom și (B) tumoare pulmonară folosind kitul Beckman Coulter pentru citometrie în flux.

Figura 107: Schema procesului de preparare a LN-144 crioconservate Gen 2.

Figura 108: Schema studiului clinic faza 2, în centre multiple, a TIL crioconservate noi administrate la pacienți cu melanom metastatic.

Figura 109: Tabel care ilustrează compararea caracteristicilor pacienților din grupul 1 (ASCO 2017) vs grupul 2.

Figura 110: Tabel care ilustrează evenimentele adverse apărute în tratament ($\geq 30\%$).

Figura 111: Eficiența produsului perfuzabil și terapiei TIL.

Figura 112: Starea clinică a pacienților cu răspuns evaluabil cu SD sau un răspuns mai bun.

Figura 113: Modificarea procentuală a sumei diametrelor.

Figura 114: O creștere a nivelului HMGB 1 s-a observat la tratamentul cu TIL.

Figura 115: O creștere a biomarkerului IL-10 s-a observat post-perfuzie LN-144.

Figura 116: Caracteristici actualizate ale pacienților pentru grupul 2 din studiul clinic faza 2 în melanom metastatic din al doilea subset de date (N = 17 pacienți).

Figura 117: Evenimentele adverse apărute în tratament pentru grupul 2 ($\geq 30\%$) din al doilea subset de date (N = 17 pacienți).

Figura 118: Timp până la răspuns pentru pacienți evaluabili (boală stabilă sau ameliorată) în grupul 2 din al doilea subset de date (N = 17 pacienți). Din cei 10 pacienți din setul de eficiență, un pacient (pacientul 10) nu a fost evaluabil din cauza decesului legat de melanom înainte de prima evaluare a tumorii și nu este reprezentat în figură.

Figura 119: Date de eficiență actualizate pentru grupul 2 din al doilea subset de date (N = 17 pacienți). Numărul mediu al TIL perfuzate este 34×10^9 . Numărul mediu al terapiilor anterioare a fost 4.5. Pacienții cu o mutație BRAF au răspuns la fel ca pacienții cu BRAF de tip sălbatic (* se referă la pacienți cu o mutație BRAF). Un pacient (pacientul 10) nu a fost evaluabil din cauza decesului legat de melanom înainte de prima evaluarea a tumorii, dar a fost luat în considerare în setul de eficiență. Abrevieri: PR, răspuns parțial; SD, boală stabilă; PD, boală progresivă.

Figura 120: Date de eficiență actualizate pentru pacienți evaluabili din grupul 2 din al doilea subset de date (N = 17 pacienți). * indică un pacient neevaluabil care nu a ajuns la prima evaluare. Toți pacienții evaluabili cu privire la eficiență au primit terapii anterioare cu inhibitori ai punctelor de control anti-PD-1 și anti-CTLA-4.

Figura 121: Tomografie computerizată reprezentativă a unui pacient (003-015) cu PR din grupul 2, al doilea subset de date.

Figura 122: Corelarea inducerii IFN- γ de către TIL înainte de perfuzie cu reducere clinică a dimensiunii tumorii în ziua 42 post-perfuzie TIL.

Figura 123: Nivelurile IP-10 (CXCL10) (pg/mL, \log_{10}) pre- și post-perfuzie a unei aplicări a produsului TIL din Gen 2. IP-10 este un marker al adeziunii și direcționării celulelor.

Figura 124: Nivelurile IP-10 (CXCL10) (pg/mL, \log_{10}) pre- și post-perfuzie a unei aplicări a produsului TIL din Gen 1.

Figura 125: Nivelurile MCP-1 (pg/mL, \log_{10}) pre- și post-perfuzie a unei aplicări a produsului TIL din Gen 2. MCP-1 este un marker al adeziunii și direcționării celulelor.

Figura 126: Nivelurile MCP-1 (pg/mL, \log_{10}) pre- și post-perfuzie a unei aplicări a produsului TIL din Gen 1.

Figura 127: Date din studiile faza 2 în carcinom de col uterin și carcinom cu celule scuamoase la cap și gât (HNSCC). SD = boală stabilă. PR = boală progresivă. PR = răspuns parțial.

SCURTĂ DESCRIERE A LISTEI SECVENȚELOR

SEQ ID NO:1 este secvența aminoacidică a lanțului greu al muromonab.

SEQ ID NO:2 este secvența aminoacidică a lanțului ușor al muromonab.

SEQ ID NO:3 este secvența aminoacidică a unei proteine umane recombinante IL-2.

SEQ ID NO:4 este secvența aminoacidică a aldesleukinei.

SEQ ID NO:5 este secvența aminoacidică a unei proteine umane recombinante IL-4.

SEQ ID NO:6 este secvența aminoacidică a unei proteine umane recombinante IL-7.

SEQ ID NO:7 este secvența aminoacidică a unei proteine umane recombinante IL-15.

SEQ ID NO:8 este secvența aminoacidică a unei proteine umane recombinante IL-21.

DESCRIERE DETALIATĂ A INVENȚIEI

5 I. Introducere

Terapia celulară adoptivă care utilizează TIL cultivate *ex vivo* prin protocolul de expansiune rapidă (REP) a produs o terapie celulară adoptivă de succes în urma imunosupresiei gazdei la pacienți cu melanom. Parametrii actuali de acceptare a transferului se bazează pe citirile compoziției TIL (*de ex.*, pozitivitate CD28, CD8 sau CD4) și pe gradul numeric de expansiune și viabilitatea produsului REP.

10 Protocoloalele REP actuale oferă puține informații privind starea de sănătate a TIL care vor fi administrate pacientului. Celulele T suferă o deplasare metabolică profundă în timpul maturizării de la celule naive la celule T efectoare (vezi Chang, et al., Nat. Immunol. 2016,17, 364, în special pentru discuția referitoare la markerii metabolismului anaerob și aerob). De exemplu, celulele T naive se bazează pe respirația mitocondrială pentru a produce ATP, în timp ce celulele T efectoare mature, sănătoase, cum ar fi

15 TIL, sunt foarte glicolitice, bazându-se pe glicoliza aerobă pentru furnizarea substraturilor bioenergetice necesare pentru înmulțire, migrare, activare și eficiența anti-tumorală.

 Lucrările anterioare raportează că limitarea glicolizei și favorizarea metabolismului mitocondrial în TIL înainte transferului sunt dezirabile fiindcă celulele care se bazează în mare măsură pe glicoliză vor suferi privare de nutrienți la transferul adoptiv, ducând la moartea celor mai multe dintre celulele transferate. Astfel, se specifică în domeniu că favorizarea metabolismului mitocondrial ar putea susține

20 longevitatea in vivo și sugerează folosirea inhibitorilor de glicoliză înaintea inducerii răspunsului imun. Vezi Chang et al. (Chang, et al., Nat. Immunol. 2016, 17(364).

 Se divulgă în prezenta, deși fără a se revendica, metode de evaluare și cuantificare a acestei creșteri a sănătății metabolice. Se divulgă așadar în prezenta, metode de testare a sănătății relative a unei populații

25 TIL folosind una sau mai multe evaluări generale ale metabolismului, inclusiv, dar nelimitativ, ratele și cantitățile de glicoliză, fosforilare oxidativă, capacitatea respiratorie de rezervă (SRC) și rezerva glicolitică.

 De asemenea, se divulgă în prezenta, deși fără a se revendica, metode de evaluare și cuantificare a acestei creșteri a sănătății metabolice. Se divulgă așadar în prezenta, deși fără a se revendica, metode de

30 testare a sănătății relative a unei populații TIL folosind una sau mai multe evaluări generale ale metabolismului, inclusiv, dar nelimitativ, ratele și cantitățile de glicoliză, fosforilare oxidativă, capacitatea respiratorie de rezervă (SRC) și rezerva glicolitică.

 În plus, evaluările suplimentare opționale includ, nelimitativ, producția ATP, masa mitocondrială și absorbția glucozei.

35 II. Definiții

 Dacă nu se definesc în alt mod, toți termenii tehnici și științifici folosiți în prezenta au sensul înțeles în mod uzual în domeniul căruia îi aparține invenția.

 Termenul "*in vivo*" se referă la un eveniment care are loc în corpul unui subiect.

 Termenul "*in vitro*" se referă la un eveniment care are loc în exteriorul corpului unui subiect. Testele in vitro includ teste pe bază celulară, în care se folosesc celule vii sau moarte, și pot include de

40 asemenea un test fără celule, în care nu se utilizează celule intacte.

 Termenul "*ex vivo*" se referă la un eveniment care presupune tratarea sau efectuarea unei proceduri asupra unei celule, unui țesut și/sau organ care a fost îndepărtat din corpul unui subiect. În mod corespunzător, celula, țesutul și/sau organul poate fi returnat în corpul subiectului într-o metodă chirurgicală sau de tratament.

45 Termenul "expansiune rapidă" înseamnă o creștere a numărului de TIL antigen-specifice de cel puțin circa 3 ori (sau 4, 5, 6, 7, 8, sau 9 ori) într-o perioadă de o săptămână, mai preferabil cel puțin de circa 10 ori (sau 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 sau 90 de ori) într-o perioadă de o săptămână sau cel mai preferabil cel puțin de circa 100 de ori într-o perioadă de o săptămână. Mai multe protocoale de expansiune rapidă sunt prezentate mai jos.

50 Prin "limfocite infiltrante în tumori" sau "TIL" se înțelege în prezenta o populație de celule obținute inițial ca globule albe care au ieșit din fluxul sanguin al unui subiect și au migrat într-o tumoare. TIL includ, nelimitativ, celule T CD8⁺ citotoxice (limfocite), celule T Th1 și Th17 CD4⁺, celule natural killer, celule dendritice și macrofage M1. TIL includ TIL primare și secundare. "TIL primare" sunt cele obținute din probe tisulare de la pacient, așa cum se descrie în prezenta (denumite uneori ca fiind "proaspăt

55 recoltate"), iar "TIL secundare" sunt orice populații celulare TIL care au fost amplificate sau proliferate așa cum se discută în prezenta, inclusiv, dar nelimitativ, TIL în masă și TIL amplificate ("TIL REP" sau "TIL post-REP"). Populațiile de celule TIL pot include TIL modificate genetic.

 Prin "populație de celule" (inclusiv TIL) se înțelege în prezenta un număr de celulare având trăsături comune. În general, populațiile variază de la 1×10^6 la 1×10^{10} , diferite populații TIL cuprinzând

numere diferite. De exemplu, creșterea inițială a TIL primare în prezența IL-2 duce la o populație TIL de aproximativ 1×10^8 celule. Expansiunea REP se realizează în general pentru a furniza populații de 1.5×10^9 până la 1.5×10^{10} celule pentru transfer.

Prin "TIL crioconservate" se înțelege în prezența că TIL, primare, în masă sau amplificate (TIL REP) sunt tratate și depozitate în intervalul de circa -150°C până la -60°C . Metode generale de crioconservare se descriu de asemenea în altă parte în prezența, inclusiv în Exemple. Pentru claritate, "TIL crioconservate" se disting de probele tisulare congelate care pot fi folosite ca sursă de TIL primare.

Prin "TIL crioconservate decongelate" se înțelege în prezența o populație de TIL care a fost crioconservată anterior și apoi tratată pentru a reveni la temperatura camerei sau mai mare, inclusiv, dar nelimitativ, temperaturi de cultură celulară sau temperaturi la care TIL se pot administra unui pacient.

TIL pot fi definite în general biochimic, folosind markeri de suprafață celulară, sau funcțional, prin capacitatea lor de a se infiltra în tumori și de a realiza tratamentul. TIL pot fi clasificate în general prin expresia unuia sau mai multora dintre următorii biomarkeri: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 și CD25. În plus și alternativ, TIL pot fi definite funcțional prin capacitatea lor de a se infiltra în tumori solide la reintroducere într-un pacient.

Termenul "mediu de crioconservare" se referă la orice mediu care poate fi folosit pentru crioconservarea celulelor. Aceste medii pot include medii cuprinzând 7% până la 10% DMSO. Mediile exemplificative includ CryoStor CS10, Hyperthermasol, precum și combinații ale acestora. Termenul "CS10" se referă la un mediu de crioconservare obținut de la Stemcell Technologies sau de la Biolife Solutions. Mediul CS10 poate fi denumit cu marca comercială "CryoStor® CS10". Mediul CS10 este un mediu fără ser, fără componente animale, cuprinzând DMSO.

Termenul "celulă T de memorie centrală" se referă la un subset de celule T care, la om, sunt CD45R0+ și exprimă constitutiv CCR7 (CCR7^{hi}) și CD62L (CD62^{hi}). Fenotipul de suprafață al celulelor T de memorie centrală include și TCR, CD3, CD127 (IL-7R) și IL-15R. Factorii de transcriere pentru celule T de memorie centrală includ BCL-6, BCL-6B, MBD2 și BMI1. Celulele T de memorie centrală secretă în principal IL-2 și CD40L ca molecule efectoare după inițierea TCR. Celulele T de memorie centrală sunt predominante în compartimentul CD4 în sânge și la om sunt îmbogățite proporțional în ganglioni limfatici și amigdale.

Termenul "celulă T de memorie efectoare" se referă la un subset de celule T umane sau de mamifere care, la fel ca celulele T de memorie centrală, sunt CD45R0+, dar și-au pierdut expresia constitutivă a CCR7 (CCR7^{lo}) și sunt eterogene sau reduse pentru expresie CD62L (CD62L^{lo}). Fenotipul de suprafață al celulelor T de memorie centrală include și TCR, CD3, CD127 (IL-7R) și IL-15R. Factorii de transcriere pentru celule T de memorie centrală includ BLIWI1. Celulele T de memorie efectoare secretă rapid niveluri mari de citokine inflamatorii în urma stimulării antigenice, inclusiv interferon- γ , IL-4 și IL-5. Celulele T de memorie efectoare sunt predominante în compartimentul CD8 în sânge și la om sunt îmbogățite proporțional în plămân, ficat și intestin. Celulele T de memorie efectoare CD8+ prezintă cantități mari de perforină.

Termenul "sistem închis" se referă la un sistem care este închis față de mediul exterior. Se poate folosi orice sistem închis corespunzător pentru metodele de cultură celulară utilizabile cu metodele din prezența invenției. Sistemele închise includ, de exemplu, nelimitativ, recipiente G închise. După ce se adaugă un segment tumoral în sistemul închis, sistemul nu se mai deschide la exterior până când TIL sunt gata de administrare la pacient.

Termenii "fragmentare", "fragment" și "fragmentat", în sensul folosit în prezența pentru a descrie procese de distrugere a unei tumori, include metode de fragmentare mecanice precum sfărâmare, tăiere, secționare și fărâmițare a țesutului tumoral, precum și orice altă metodă de distrugere a structurii fizice a țesutului tumoral.

Termenii "celule mononucleare din sângele periferic" și "PBMC" se referă la o celulă din sângele periferic având un nucleu rotund, inclusiv limfocite (celule T, celule B, celule NK) și monocite. De preferință, celulele mononucleare din sângele periferic sunt celule mononucleare din sângele periferic alogene iradiate. PBMC sunt un tip de celulă de prezentare a antigenului.

Termenul "anticorp anti-CD3" se referă la un anticorp sau o variantă a acestuia, *de ex.*, un anticorp monoclonal și incluzând anticorpi umani, umanizați, himerici sau murini direcționați împotriva receptorului CD3 în receptorul antigenic T celular al celulelor T mature. Anticorpii anti-CD3 includ OKT-3, cunoscut și ca muromonab. Anticorpii anti-CD3 includ de asemenea clona UHCT1, cunoscută și ca T3 și CD3e. Alți anticorpi anti-CD3 includ, de exemplu, orelizumab, teplizumab și visilizumab.

Termenul "OKT-3" (denumit în prezența și "OKT3") se referă la un anticorp monoclonal sau biosimilar sau o variantă a acestuia, inclusiv anticorpi umani, umanizați, himerici sau murini direcționați împotriva receptorului CD3 în receptorul antigenic T celular al celulelor T mature, și include formele din comerț cum ar fi OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 pur, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA)

și muromonab sau variantele sale, substituții aminoacidice conservative, glicoforme sau biosimilari. Secvențele aminoacidice ale lanțurilor grele și ușoare ale muromonab sunt indicate în Tabelul 1 (SEQ ID NO: 1 și SEQ ID NO:2). Un hibridom capabil să producă OKT-3 este deținut de American Type Culture Collection și are nr. de referință ATCC CRL 8001. Un hibridom capabil să producă OKT-3 este de asemenea deținut de European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) și are nr. de catalog 86022706.

TABEL 1. Secvențe aminoacidice ale muromonab.

Denumire	Secvență (simboluri de aminoacizi de o literă)	
SEQ ID NO:1 lanț greu muromonab	SVYQLQSSGAR LAPPFAGVYK HFKASNYTET RYTMERKVROR PGGKLEWYAY INFNRKYTN NQRFKREKEL TTDGSSSTAY MQLSSDSSD SSVYACDPEY EDRVQDQYQ QDTLTVSSA KTDARGVHL APVQDFTGS SVYLGCLVKG YFFRPTLKR NGSYSSQVH TFFAVLQSDL YDLGGVYVT SSTWRQSDIT CNVLEHAGST FVLRKTEGSD KSDSKYHDF PCFAPPELLQ PAVPLPFRPE KDTLMIKRTS EYTVVVVNS HEDFVYKRNK YVQGVNHHH PTFPRRQYR STYRVYSVAT VSGQDLNGE EYFQVSNKA LPAPFKTYS KAKGDFEEDQ VYTEDSRRE YKNGVNLID LAKGFPYSDY AVNWSNGQP ENNRKTFPV LAGLGGFFLY SKLTVKSRW QCGNVFHCIV HREALHNYT QKSLSLSTPK	60 120 180 240 300 360 420 480
SEQ ID NO:2 lanț ușor muromonab	QIVATQSPAI MSASGPKVYV MGRASSSVS YNNVQQRSG TSPKREYDT SKLASGVPK PRGGSGTAY SLTTSQEAR DAATYVQQW SNEPFTFGG TLELNRACT AVTVSDFRS SEQLGGGAS VYCFNNFYV KDFNVKKID GSERQGVLIH NTEQESNDS TVSMSTLTL TKDEYERHNS YTCRATKTS TSPVKEFNP NEC	60 120 180 213

Termenul "IL-2" (denumit în prezenta și "IL2") se referă la factorul de creștere T celular cunoscut ca interleukina-2 și include toate formele IL-2, inclusiv forme umane și de mamifer, substituții aminoacidice conservative, glicoforme, biosimilari și variante ale acestora. IL-2 este descris, *de ex.*, în Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88 și Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79. Secvența aminoacidică a IL-2 umane recombinante adecvate pentru utilizare în invenție este indicată în Tabelul 2 (SEQ ID NO:3). De exemplu, termenul IL-2 include forme umane, recombinante, ale IL-2 cum ar fi aldesleukina (PROLEUKIN, disponibilă în comerț de la mai mulți furnizori în 22 de milioane IU per fiole de unică folosință), precum și forma IL-2 recombinantă furnizată în comerț de CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) sau ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (nr. cat. CYT-209-b) și alte echivalențe comerciale de la alți vânzători. Aldesleukina (desalanil-1, IL-2 serin-125 umană) este o formă umană recombinantă neglicozilată a IL-2 cu o greutate moleculară de aproximativ 15 kDa. Secvența aminoacidică a aldesleukinei adecvate pentru utilizare în invenție este indicată în Tabelul 2 (SEQ ID NO:4). Termenul IL-2 include și forme pegilate ale IL-2, descrise în prezenta, inclusiv promedicamentul IL2 pegilat NKTR-214, disponibil de la Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA. NKTR-214 și IL-2 pegilat adecvate pentru utilizare în invenție se descriu în documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2014/0328791 A1 și documentația cererii de brevet internațional nr. WO 2012/065086 A1. Forme alternative ale IL-2 conjugate adecvate pentru utilizare în invenție se descriu în brevetele U.S. nr. 4,766,106, 5,206,344, 5,089,261 și 4902,502. Formele IL-2 adecvate pentru utilizare în invenție se descriu în brevetul U.S. nr. 6,706,289.

TABEL 2. Secvențele aminoacidice ale interleukinelor.

Denumire	Secvență (simboluri de aminoacizi de o literă)	
SEQ ID NO:3 IL-2 umană recombinantă (rhIL-2)	NAFSSSTK TQLQLHLL DLQHLNQTN NYKPKLIRM LEFRPYMKR ATELKHLQCL EERLKLSEV LNLAGNHEH LRFDELFSNI NVIVLSDKGS EEFPMQRYAD RTATVDFEIN RWITFGQSYI SLTL	60 120 184
SEQ ID NO:4 Aldesleukina	PFGSSTKQ LQELHLLD QMLNGTNY KNPKILRMLT EFPMPKRAI ELKHQCLRE ELRPLREVIN LAQKNEHLE PRLISNTNV IVLRKGGSET TFMQRYADST RTVDFEINRW TFSQSITST LT	60 120 180
SEQ ID NO:5 IL-4 umană recombinantă (rhIL-4)	MHRCDITLQE LIETLNLHLE QFTLCTELTV TDFPAGSHT TERTETGKAA IVLRQFVGH ENDFRCLGAT AQDFRHHQL IRFLRLDRH LNLGLQLNSQ FYKSAHQSTL ENFERLNTI MREKYSKGS	60 120 180
SEQ ID NO:6 IL-7 umană recombinantă (rhIL-7)	MDDIEGKDG KQYSEVLNVS IDQLLDSMKE TCSNQLNHEF HFFRHTODA NKEGMELFA ARNLRQFLRM NSTGDFLAL LKVSGETTIL LKCTQVYGR KPAALGDAQP TKSLEENKEL KEKKILNGL ELKRLQETK TCKNKLMEY NEH	60 120 183
SEQ ID NO:7 IL-15 umană recombinantă (rhIL-15)	MNAVHVLSDL KKIIEELFQRM HIDATLNTES DVRSCKVTA MRCFALLEQV ISLRSQDAST SDTVENLTL ANNSLSSNGN VTESCKEKEE ELRRKNIKEF LQSPVHTVQM FTNTS	60 115
SEQ ID NO:8 IL-21 umană recombinantă (rhIL-21)	MQRPMIRMR QLEIDVQKQ RYVNDLVEFP LPAPREVEN CWSAFSDFQ KALKRSANIG NNRKTNVST KKLKRSFST WAGRQKHL TCFSESVEN NEKKEFLSF KSLIQRMIRH RLARSRNGSE DG	60 120 182

Termenul "IL-4" (denumit în prezenta și "IL4") se referă la citokina cunoscută ca interleukina 4, produsă de celule T Th2 și de eozinofile, bazofile și mastocyte. IL-4 reglează diferențierea celulelor T helper naive (celule Th0) în celule T Th2. Steinke & Borish, *Respir. Res.* 2001, 2, 66-70. La activare de către IL-4, celulele T Th2 produc IL-4 suplimentară într-un circuit de feedback pozitiv. IL-4 stimulează și înmulțirea celulelor B și expresia MHC clasa II și induce comutarea clasei în expresie IgE și IgG₁ din celule B. IL-4 umană recombinantă adecvată pentru utilizare în invenție se găsește în comerț de la mai mulți furnizori, inclusiv ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (nr. cat. CYT-211) și ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteina umană IL-15 recombinantă, nr. cat. Gibco CTP0043). Secvența aminoacidică a IL-4 umane recombinante adecvate pentru utilizare în invenție este indicată în Tabelul 2 (SEQ ID NO:5).

Termenul "IL-7" (denumit în prezenta și "IL7") se referă la o citokină derivată din țesut glicozilată cunoscută ca interleukina 7, care poate fi obținută din celule stromale și epiteliale, precum și din celule dendritice. Fry & Mackall, *Blood* 2002, 99, 3892-904. IL-7 poate stimula dezvoltarea celulelor T. IL-7 se leagă de receptorul IL-7, un heterodimer constând din receptorul lanțului alpha și gamma comun al receptorului IL-7, într-o serie de semnale importante pentru dezvoltarea celulelor T în timus și supraviețuire periferică. IL-7 umană recombinantă adecvată pentru utilizare în invenție se găsește în comerț de la mai mulți furnizori, inclusiv ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (nr. cat. CYT-254) și ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteina umană IL-15 recombinantă, nr. cat. Gibco PHC0071). Secvența aminoacidică a IL-7 umane recombinante adecvate pentru utilizare în invenție este indicată în Tabelul 2 (SEQ ID NO:6).

Termenul "IL-15" (denumit în prezenta și "IL15") se referă la factorul de creștere T celular cunoscut ca interleukina-15 și include toate formele IL-2, inclusiv forme umane și de mamifer, substituții aminoacidice conservative, glicoforme, biosimilari și variante ale acestora. IL-15 este descrisă, *de ex.*, în Fehniger & Caligiuri, *Blood* 2001, 97, 14-32. IL-15 are în comun subunitățile receptorilor de semnalizare β și γ cu IL-2. IL-15 umană recombinantă este un singur lanț polipeptidic neglicozilat conținând 114 aminoacizi (și o metionină N-terminală) cu o masă moleculară de 12.8 kDa. IL-15 umană recombinantă se găsește în comerț de la mai mulți furnizori, inclusiv ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (nr. cat. CYT-230-b) și ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteina umană IL-15 recombinantă, nr. cat. 34-8159-82). Secvența aminoacidică a IL-15 umană recombinantă adecvată pentru utilizare în invenție este indicată în Tabelul 2 (SEQ ID NO:7).

Termenul "IL-21" (denumit în prezenta și "IL21") se referă la proteina citokină pleiotropică cunoscută ca interleukina-21 și include toate formele IL-21, inclusiv forme umane și de mamifer, substituții aminoacidice conservative, glicoforme, biosimilari și variante ale acestora. IL-21 este descrisă, *de ex.*, în Spolski & Leonard, *Nat. Rev. Drug. Disc.* 2014,13, 379-95. IL-21 este produsă în principal de celule T natural killer și celule T CD4⁺ umane activate. IL-21 umană recombinantă este un singur lanț polipeptidic neglicozilat conținând 132 de aminoacizi cu o masă moleculară de 15.4 kDa. IL-21 umană recombinantă se găsește în comerț de la mai mulți furnizori, inclusiv ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (nr. cat. CYT-408-b) și ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteina umană IL-21 recombinantă, nr. cat. 14-8219-80). Secvența aminoacidică a IL-21 umane recombinante adecvate pentru utilizare în invenție este indicată în Tabelul 2 (SEQ ID NO:8).

Când se indică "o cantitate eficientă anti-tumorală", "o cantitate eficientă de inhibare a tumorii" sau "o cantitate terapeutică", cantitatea exactă a compozițiilor din prezenta invenție de administrat poate fi determinată de un medic ținând cont de diferențele individuale de vârstă, greutate, dimensiunea tumorii, gradul de infecție sau metastază și starea pacientului (subiectului). Se poate afirma în general că o compoziție farmaceutică ce conține limfocitele infiltrante în tumori (de ex. TIL secundare sau limfocite citotoxice modificate genetic) descrise în prezenta se poate administra la un dozaj de 10^4 până la 10^{11} celule/kg de greutate corporală (de ex., 10^5 până la 10^6 , 10^5 până la 10^{10} , 10^5 până la 10^{11} , 10^6 până la 10^{10} , 10^6 până la 10^{11} , 10^7 până la 10^{11} , 10^7 până la 10^{10} , 10^8 până la 10^{11} , 10^8 până la 10^{10} , 10^9 până la 10^{11} sau 10^9 până la 10^{10} celule/kg de greutate corporală), inclusiv toate valorile întregi din aceste intervale. Compozițiile de limfocite infiltrante în tumori (inclusiv, în unele cazuri, limfocite citotoxice modificate genetic) se pot administra de asemenea de mai multe ori la aceste dozaje. Limfocitele infiltrante în tumori (inclusiv, în unele cazuri, cele modificate genetic) se pot administra folosind tehnici de perfuzie cunoscute în imunoterapie (vezi, de ex., Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). Dozajul optim și regimul de tratament pentru un anumit pacient se pot determina cu ușurință de către persoanele cu competențe în domeniul medical prin monitorizarea pacient cu privire la semne de boală și ajustarea tratamentului în consecință.

Termenul "malignitate hematologică" se referă la cancere ale mamiferelor și tumori ale țesuturilor hematopoietice și limfoide, inclusiv, dar nelimitativ, țesuturi sanguine, din măduva osoasă, ganglioni

limfatici și sistemul limfatic. Malignitățile hematologice sunt denumite și "tumori lichide". Malignitățile hematologice includ, nelimitativ, leucemie limfoblastică acută (ALL), limfom limfocitar cronic (CLL), limfom limfocitar mic (SLL), leucemie mieloidă acută (AML), leucemie mieloidă cronică (CML), leucemie monocitară acută (AMoL), limfom Hodgkin și limfoame non-Hodgkin. Termenul "malignitate hematologică B celulară" se referă la malignități hematologice care afectează celulele B.

Termenul "tumoare solidă" se referă la o masă anormală de țesut care de obicei nu cuprinde chisturi sau zone lichide. Tumorile solide pot fi benigne sau maligne. Termenul "cancer tumoral solid" se referă la tumori maligne, neoplazice sau canceroase. Cancerurile tumorale solide includ, nelimitativ, sarcoame, carcinoame și limfoame, cum ar fi cancer pulmonar, mamar, de prostată, colon, rect și vezică. Structura tisulară a tumorilor solide include compartimente tisulare interdependente inclusiv parenchim (celule canceroase) și celulele stromale de suport în care celulele canceroase sunt dispersate și care pot asigura un micromediu de susținere.

Termenul "tumoare lichidă" se referă o masă anormală de celule de natură fluidă. Cancerurile tumorale lichide includ, nelimitativ, leucemii, mieloame și limfoame, precum și alte malignități hematologice. TIL obținute din tumori lichide pot fi denumite de asemenea în prezenta limfocite infiltrante în măduvă (MIL).

Termenul "micromediu", în sensul folosit în prezenta, se poate referi la micromediul tumorilor solide sau hematologice ca un întreg sau la un subset individual de celule în micromediu. Micromediul tumoral, în sensul folosit în prezenta, se referă la un amestec complex de "celule, factori solubili, molecule de semnalizare, matrice extracelulare și indicii mecanice care susțin transformarea neoplazică, susțin creșterea și invazia tumorală, protejează tumoarea de imunitatea gazdei, stimulează rezistența la agenți terapeutici și asigură nișe în care se pot dezvolta metastazele dominante", așa cum se descrie în Swartz, et al., Cancer Res., 2012, 72, 2473. Deși tumorile exprimă antigene care ar trebui să fie recunoscute de celule T, eliminarea tumorii de către sistemul imunitar este rară din cauza imunosupresiei de către micromediu.

Se divulgă de asemenea în prezenta, deși fără a se revendica, o metodă de tratare a unui cancer cu o populație de TIL, unde un pacient este pre-tratat cu chimioterapie non-mieloablativă înainte unei perfuzii de TIL conform invenției. Poate fi prevăzută o populație de TIL, unde un pacient este pre-tratat cu chimioterapie non-mieloablativă înainte unei perfuzii de TIL conform prezentei invenții. Chimioterapia non-mieloablativă constă din ciclofosamidă 60 mg/kg/zi 2 zile (zilele 27 și 26 înainte perfuziei TIL) și fludarabină 25 mg/m²/zi 5 zile (zilele 27 - 23 înainte perfuziei TIL). Într-o aplicare, după chimioterapia non-mieloablativă și perfuzia TIL (ziua 0) pacientul primește o perfuzie intravenoasă de IL-2 la 720.000 IU/kg din 8 în 8 ore până la toleranță fiziologică.

Observațiile experimentale arată că limfodepleția înainte transferului adoptiv al limfocitelor T specifice tumorii are un rol esențial în creșterea eficienței tratamentului prin eliminarea celulelor T reglatoare și a elementelor concurente ale sistemului imunitar ("cytokine sinks"). Astfel, se poate utiliza o etapă de limfodepleție (denumită uneori "condiționare imunosupresoare") la pacient înainte introducerii rTIL din invenție.

Termenii "co-administrat", "co-administrare", "administrat în combinație cu", "administrare în combinație cu", "simultan" și "concomitent", în sensul folosit în prezenta, includ administrarea a două sau mai multe ingrediente farmaceutice active (într-o aplicare preferată a prezentei invenții, de exemplu, cel puțin un agonist al canalului de potasiu în combinație cu mai multe TIL) la un subiect astfel încât ambele ingrediente farmaceutice active și/sau metaboliții lor să fie prezenți în subiect în același timp. Co-administrarea include administrarea simultană în compoziții separate, administrare la intervale diferite în compoziții separate sau administrare într-o compoziție în care sunt prezente două sau mai multe ingrediente farmaceutice active. Se preferă administrarea simultană în compoziții separate și administrarea într-o compoziție în care sunt prezenți ambii agenți.

Termenul "cantitate eficientă" sau "cantitate terapeutic eficientă" se referă la acea cantitate a unui compus sau a unei combinații de compuși descriși în prezenta care este suficientă pentru a realiza utilizarea prevăzută inclusiv, dar nelimitativ, tratarea bolii. O cantitate terapeutic eficientă poate varia în funcție de utilizarea prevăzută (in vitro sau in vivo) sau de subiect și boala tratată (de ex., greutatea, vârsta și sexul subiectului), gravitatea bolii sau modul de administrare. Termenul se aplică și unei doze care va induce un anumit răspuns în celule țintă (de ex., reducerea adeziunii trombocitelor și/sau a migrației celulare). Doza specifică va varia în funcție de compușii specifici selectați, regimul de dozaj urmat, administrarea compusului în combinație cu alți compuși, perioada de administrare, țesutul în care se administrează și sistemul de livrare fizic în care este conținut compusul.

Termenii "tratament", "tratare", "trata" etc. se referă la obținerea unui efect farmacologic și/sau fiziologic dorit. Efectul poate fi profilactic, prevenind complet sau parțial o boală sau un simptom al acesteia, și/sau poate fi terapeutic, vindecând parțial sau complet o boală și/sau un efect advers atribuibil bolii. "Tratament", în sensul folosit în prezenta, acoperă orice tratament al unei boli la un mamifer, în special

un om, și include: (a) prevenirea apariției bolii la un subiect care poate fi predispus la boală, dar care nu a fost încă diagnosticat cu aceasta; (b) inhibarea bolii, i.e., oprirea dezvoltării sau înaintării acesteia; și (c) ameliorarea bolii, i.e., determinând regresia bolii și/sau ameliorând unul sau mai multe simptome ale acesteia. "Tratament" include de asemenea furnizarea unui agent pentru a asigura un efect farmacologic, chiar și în absența unei boli sau afecțiuni. De exemplu, "tratament" include furnizarea unei compoziții care poate determina un răspuns imun sau poate conferi imunitate în absența unei boli, de ex., în cazul unui vaccin.

Termenul "heterolog", folosit în legătură cu porțiuni ale unui acid nucleic sau ale unei proteine, indică faptul că acidul nucleic sau proteina cuprinde două sau mai multe subsecvențe care nu se găsesc în același raport una față de cealaltă în natură. De exemplu, acidul nucleic este produs în mod tipic recombinant, având două sau mai multe secvențe din gene neasociate prevăzute să producă un nou acid nucleic funcțional, de ex., un promotor dintr-o sursă și o regiune codificatoare dintr-o altă sursă sau regiuni codificatoare din surse diferite. În mod similar, o proteină heterologă indică faptul că proteina cuprinde două sau mai multe subsecvențe care nu se găsesc în același raport una față de cealaltă în natură (de ex., o proteină de fuziune).

Termenii "omologie secvențială", "omologie procentuală" și "omologie secvențială procentuală" (sau sinonime ale acestora, de ex., "99% identice"), în contextul a doi sau mai mulți acizi nucleici sau polipeptide, se referă la două sau mai multe secvențe sau subsecvențe care sunt identice sau au un procentaj specificat de nucleotide sau reziduuri aminoacidice care sunt identice, la comparare și aliniere (cu introducerea de spații, dacă este necesar) pentru corespondența maximă, fără a lua în considerare substituții aminoacidice conservative ca parte din omologia secvențială. Omologia procentuală poate fi măsurată folosind software sau algoritmi de comparare a secvențelor sau prin inspecție vizuală. Se cunosc în domeniu diferiți algoritmi și software care se pot folosi pentru a obține alinieri ale secvențelor de aminoacizi sau nucleotide. Programele adecvate de determinare a omologiei secvențiale procentuale includ de exemplu seria de programe BLAST disponibilă pe website-ul U.S. Government's National Center for Biotechnology Information BLAST. Comparațiile între două secvențe se pot efectua folosind algoritmul BLASTN sau BLASTP. BLASTN se folosește pentru a compara secvențe de acid nucleic, iar BLASTP se folosește pentru a compara secvențele aminoacidice. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) sau MegAlign, disponibile de la DNASTAR, sunt alte programe software public disponibile care se pot folosi pentru alinierea secvențelor. Persoanele cu competențe în domeniu pot determina parametrii corespunzători pentru aliniere maximă prin software de aliniere specific. În anumite aplicații, se folosesc parametrii implicați ai softului de aliniere.

În sensul folosit în prezenta, termenul "variantă" include, nelimitativ, anticorpi sau proteine de fuziune care cuprind o secvență de aminoacizi care se deosebește de secvența aminoacidică a unui anticorp de referință prin una sau mai multe substituții, deleții și/sau adăugiri la numite poziții în sau lângă secvența aminoacidică a anticorpului de referință. Varianta poate cuprinde una sau mai multe substituții conservative în secvența sa de aminoacizi față de secvența aminoacidică a unui anticorp de referință. Substituțiile conservative pot cuprinde, de ex., substituirea aminoacizilor încărcăți similar sau neîncărcăți. Varianta reține capacitatea de a se lega specific de antigenul anticorpului de referință. Termenul variantă include și anticorpi sau proteine pegilate.

Prin "limfocite infiltrante în tumori" sau "TIL" se înțelege în prezenta o populație de celule obținute inițial ca globule albe care au ieșit din fluxul sanguin al unui subiect și au migrat într-o tumoare. TIL includ, nelimitativ, celule T CD8⁺ citotoxice (limfocite), celule T Th1 și Th17 CD4⁺, celule natural killer, celule dendritice și macrofage M1. TIL includ TIL primare și secundare. "TIL primare" sunt cele obținute din probe tisulare de la pacient, așa cum se descrie în prezenta (denumite uneori ca fiind "proaspăt recoltate"), iar "TIL secundare" sunt orice populații celulare TIL care au fost amplificate sau proliferate așa cum se discută în prezenta, inclusiv, dar nelimitativ, TIL în masă, TIL amplificate ("TIL REP"), precum și "TIL reREP", așa cum se discută în prezenta. TIL reREP pot include de exemplu TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP).

TIL pot fi definite în general biochimic, folosind markeri de suprafață celulară, sau funcțional, prin capacitatea lor de a se infiltra în tumori și de a realiza tratamentul. TIL pot fi clasificate în general prin expresia unuia sau mai multora dintre următorii biomarkeri: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 și CD25. În plus și alternativ, TIL pot fi definite funcțional prin capacitatea lor de a se infiltra în tumori solide la reintroducere într-un pacient. TIL pot fi caracterizate de asemenea prin potențial - de exemplu, TIL pot fi considerate potente dacă, de exemplu, eliberarea interferon (IFN) este mai mare decât circa 50 pg/mL, mai mare decât circa 100 pg/mL, mai mare decât circa 150 pg/mL sau mai mare decât circa 200 pg/mL.

Termenii "vehicul acceptabil farmaceutic" sau "excipient acceptabil farmaceutic" includ toți solvenții, dispersanții, învelișurile, agenții antibacterieni și antifungici, agenții izotonici și de întârziere a absorbției și ingredientele inerte. Utilizarea acestor vehicule acceptabile farmaceutic sau a excipienților acceptabili farmaceutic pentru ingrediente farmaceutice active este bine cunoscută în domeniu. Cu excepția situațiilor în care oricare din vehiculele acceptabile farmaceutic sau excipienții acceptabili farmaceutic convenționali este incompatibil cu ingredientului farmaceutic activ, invenția are în vedere utilizarea sa în compozițiile terapeutice din invenție. Pot fi incluse alte ingrediente farmaceutice active, cum ar fi alte medicamente, pot fi, de asemenea, încorporate în compozițiile și metodele descrise.

Termenii "circa" și "aproximativ" înseamnă într-un interval semnificativ statistic al unei valori. Acest interval poate fi într-un ordin de mărime, de preferință în 50%, mai preferabil în 20%, mai preferabil în 10%, încă mai preferabil în 5% dintr-o valoare sau un interval dat. Variația permisă inclusă de termenii "circa" sau "aproximativ" depinde de sistemul specific studiat și poate fi ușor înțeleasă de persoanele cu competențe în domeniu. În plus, în sensul folosit în prezenta, termenii "circa" și "aproximativ" înseamnă că dimensiunile, mărimile, formele, parametrii și alte cantități și caracteristici nu sunt și nu trebuie să fie exacte, ci pot fi aproximative și/sau mai mari sau mai mici, după cum se dorește, reflectând toleranțe, factori de conversie, rotunjire, eroare de măsurare etc., și alți factori cunoscuți în domeniu. În general, o dimensiune, o mărime, o formă, un parametru sau o altă cantitate sau caracteristică este "aproximativă" indiferent dacă este astfel indicată în mod expres sau nu. Se menționează că aplicările cu dimensiuni, forme și mărimi foarte diferite ot folosi configurațiile descrise.

Termenii de tranziție "cuprinzând", "constând în esență din" și "constând din", folosiți în revendicările anexate, în forma originală și modificată, definesc sfera de acoperire a revendicărilor cu privire la faptul că elementele sau etapele suplimentare neindicate, dacă este cazul, sunt excluse din sfera de acoperire a revendicărilor. Termenul "cuprinzând" este inclusiv sau deschis și nu exclude alte elemente, metode, etape sau materiale suplimentare, neindicate. Termenul "constând din" exclude orice element, etapă sau material decât cele specificate în revendicare și, în legătură cu acesta din urmă, impurități uzuale asociate cu materialul specificat. Termenul "constând în esență din" limitează sfera de acoperire a unei revendicări la elementele, etapele sau materialele specificate și cele care nu afectează în mod considerabil caracteristicile de bază și noi ale invenției revendicate. Toate compozițiile, metodele și kiturile descrise în prezenta, care reprezintă prezenta invenție pot fi, în aplicări alternative, definite mai specific de oricare dintre termenii de tranziție "cuprinzând," "constând în esență din" și "constând din".

III. Procese de preparare TIL

Un proces TIL exemplificativ cunoscut ca proces 2A cuprinzând câteva din aceste caracteristici este indicat în Figura 1 și unele dintre avantajele acestei aplicări a prezentei invenții față de procesul 1C sunt descrise în Figura 2, la fel și în Figura 84. Procesul 1C este indicat comparativ în Figura 3. Două cronologii alternative pentru terapia TIL pe baza procesului 2A sunt indicate în Figura 4 (număr de celule mai mare) și Figura 5 (număr de celule mai mic). O aplicare a procesului 2A este indicată în Figura 6, precum și în Figura 27. Figurile 83 și 84 indică un proces 2A exemplificativ comparativ cu un proces 1C exemplificativ.

Așa cum se discută în prezenta, prezenta invenție poate include o etapă legată de restimularea TIL crioconservate pentru a le crește activitatea metabolică și astfel sănătatea relativă înaintea transplantului într-un pacient și metode de testare a sănătății metabolice. Așa cum se prezintă în general în domeniu, TIL sunt prelevate în general dintr-o probă de la un pacient și manipulate pentru a le amplifica numărul înaintea transplantului într-un pacient. În unele aplicări, TIL pot fi opțional manipulate genetic, așa cum se discută mai jos.

În unele aplicări, TIL pot fi crioconservate. După decongelare, pot fi de asemenea restimulate pentru a le crește metabolismul înaintea perfuziei într-un pacient.

Prima expansiune (inclusiv procesele denumite preREP, precum și procese indicate în Figura 27 ca etapa A) poate fi scurtată la 3 - 14 zile și a doua expansiune (inclusiv procesele denumite REP, precum și procesele indicate în Figura 27 ca etapa B) poate fi scurtată la 7 - 14 zile, așa cum se discută detaliat mai jos, precum și în exemple și figuri. În unele aplicări, prima expansiune (de exemplu, o expansiune descrisă ca etapa B în Figura 27) este scurtată la 11 zile și a doua expansiune (de exemplu, o expansiune descrisă în etapa D din Figura 27) este scurtată la 11 zile, așa cum se discută în exemple și se reprezintă în Figurile 4, 5 și 27. În unele aplicări, combinația dintre prima expansiune și a doua expansiune (de exemplu, expansiunile descrise ca etapa B și etapa D din Figura 27) este scurtată la 22 zile, așa cum se discută detaliat mai jos și în exemple și figuri.

Denumirile "etapelor" A, B, C etc. de mai jos se referă la Figura 27 și în legătură cu anumite aplicări descrise în prezenta. Ordonarea etapelor de mai jos și în Figura 27 este exemplificativă și prezenta cerere și metodele divulgate în prezenta au în vedere orice combinație sau ordine a etapelor, precum și alte etape, repetare a etapelor și/sau omisiune a etapelor.

A. ETAPA A: Obținerea probei tumorale de la pacient

În general, TIL se obțin inițial dintr-o probă tumorală de la un pacient ("TIL primare"), după care sunt amplificate într-o populație mai mare pentru manipulare suplimentară descrisă în prezenta, opțional crioconservate, restimulate, așa cum se indică în prezenta, și opțional evaluate cu privire la fenotip și parametrii metabolici ca o indicație a sănătății TIL.

O probă tumorală de la un pacient poate fi obținută folosind metode cunoscute în domeniu, în general prin rezecție chirurgicală, biopsie cu ac sau alte mijloace de obținere a unei probe conținând un amestec de celule tumorale și TIL. În general, proba tumorală poate fi din orice tumoare solidă, inclusiv tumori primare, invazive sau metastatice. Proba tumorală poate proveni de asemenea dintr-o tumoare lichidă, cum ar fi o tumoare obținută dintr-o malignitate hematologică. Tumoarea solidă poate fi orice tip de cancer, inclusiv, dar nelimitativ, mamar, pancreatic, de prostată, colorectal, pulmonar, cerebral, renal, stomacal și de piele (inclusiv, dar nelimitativ, carcinom cu celule scuamoase, carcinom cu celule bazale și melanom). În unele aplicări, TIL utile se obțin din tumori maligne de melanom, acestea fiind raportate ca având niveluri deosebit de ridicate de TIL.

Termenul "tumoare solidă" se referă la o masă anormală de țesut care de obicei nu cuprinde chisturi sau zone lichide. Tumorile solide pot fi benigne sau maligne. Termenul "cancer tumoral solid" se referă la tumori maligne, neoplazice sau canceroase. Cancerelor tumorale solide includ, nelimitativ, sarcoame, carcinoame și limfoame, cum ar fi cancer pulmonar, mamar, cancer mamar triplu negativ, de prostată, colon, rect și vezică. În unele aplicări, cancerul este selectat dintre cancer de col uterin, cancer la cap și gât (inclusiv, de exemplu, carcinom cu celule scuamoase la cap și gât (HNSCC)), glioblastom, cancer ovarian, sarcom, cancer pancreatic, cancer de vezică, cancer mamar, cancer mamar triplu negativ și carcinom pulmonar macrocelular. Structura tisulară a tumorilor solide include compartimente tisulare interdependente inclusiv parenchim (celule canceroase) și celulele stromale de suport în care celulele canceroase sunt dispersate și care pot asigura un micromediu de susținere.

Termenul "malignitate hematologică" se referă la cancere ale mamiferelor și tumori ale țesuturilor hematopoietice și limfoide, inclusiv, dar nelimitativ, țesuturi sanguine, din măduva osoasă, ganglioni limfatici și sistemul limfatic. Malignitățile hematologice sunt denumite și "tumori lichide". Malignitățile hematologice includ, nelimitativ, leucemie limfoblastică acută (ALL), limfom limfocitar cronic (CLL), limfom limfocitar mic (SLL), leucemie mieloidă acută (AML), leucemie mieloidă cronică (CML), leucemie monocitară acută (AMoL), limfom Hodgkin și limfoame non-Hodgkin. Termenul "malignitate hematologică B celulară" se referă la malignități hematologice care afectează celulele B.

După ce s-a obținut, proba tumorală este în general fragmentată prin disecție în bucăți mici între 1 până la circa 8 mm³, fiind utili în special circa 2-3 mm³. TIL sunt cultivate din aceste fragmente folosind digestii tumorale enzimatiche. Aceste digestii tumorale pot fi produse prin incubare în medii enzimatiche (*de ex.*, soluție tampon Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, 2 mM glutamat, 10 mcg/mL gentamicină, 30 unități/mL DNaza și 1.0 mg/mL colagenaza), urmată de disociere mecanică (*de ex.*, folosind un disociator tisular). Digestiile tumorale pot fi produse prin așezarea tumorii în mediu enzimatic și disocierea mecanică a tumorii aproximativ 1 minut, urmate de incubare 30 de minute la 37°C în 5% CO₂, urmată de cicluri repetate de disociere mecanică și incubare în condițiile de mai sus până când sunt prezente numai bucăți mici de țesut. La sfârșitul acestui proces, dacă suspensia celulară conține un număr mare de globule roșii sau celule moarte, se poate efectua o separare în gradient de densitate folosind polizaharidă hidrofilă ramificată FICOLL pentru îndepărtarea acestor celule. Se pot folosi metode alternative cunoscute în domeniu, cum ar fi cele descrise în documentația cererii de brevet U.S. nr. 2012/0244133 A1. Se poate folosi oricare dintre metodele de mai sus în oricare dintre aplicările descrise în prezenta pentru expansiunea TIL.

În general, suspensia celulară recoltată este denumită "populație celulară primară" sau populație celulară "proaspăt recoltată".

În unele aplicări, fragmentarea include fragmentare fizică, inclusiv de exemplu dizecție, precum și digestie. În unele aplicări, fragmentarea este fragmentare fizică. În unele aplicări, fragmentarea este prin disecție. În unele aplicări, fragmentarea este prin digestie. În unele aplicări, TIL pot fi cultivate inițial din digestii tumorale enzimatiche și fragmente tumorale obținute de la pacienți. Într-o aplicare, TIL pot fi cultivate inițial din digestii tumorale enzimatiche și fragmente tumorale obținute de la pacienți.

În unele aplicări, unde tumoarea este o tumoare solidă, tumoarea suferă fragmentare fizică după obținerea probei tumorale, de exemplu, în etapa A (prevăzută în Figura 27). În unele aplicări, fragmentarea are loc înainte de crioconservare. În unele aplicări, fragmentarea are loc după crioconservare. În unele aplicări, fragmentarea are loc după obținerea tumorii și în absența crioconservării. În unele aplicări, tumoarea este fragmentată și 10, 20, 30, 40 sau mai multe fragmente sau bucăți se introduc în fiecare recipient pentru prima expansiune. În unele aplicări, tumoarea este fragmentată și 30 sau 40 fragmente sau bucăți se introduc în fiecare recipient pentru prima expansiune. În unele aplicări, tumoarea este fragmentată

și 40 fragmente sau bucăți se introduc în fiecare recipient pentru prima expansiune. În unele aplicări, fragmentele multiple cuprind circa 4 până la circa 50 fragmente, unde fiecare fragment are un volum de circa 27 mm³. În unele aplicări, fragmentele multiple cuprind circa 30 până la circa 60 fragmente cu un volum total de circa 1300 mm³ până la circa 1500 mm³. În unele aplicări, fragmentele multiple cuprind
5 circa 50 fragmente cu un volum total de circa 1350 mm³. În unele aplicări, fragmentele multiple cuprind circa 50 fragmente cu o masă totală de circa 1 gram până la circa 1.5 grame. În unele aplicări, fragmentele multiple cuprind circa 4 fragmente.

În unele aplicări, TIL se obțin din fragmente tumorale. În unele aplicări, fragmentul tumoral se obține prin disecție. În unele aplicări, fragmentul tumoral are între circa 1 mm³ și 10 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral are între circa 1 mm³ și 8 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral este de circa 1 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral este de circa 2 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral este de circa 3 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral este de circa 4 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral este de circa 5 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral este de circa 6 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral este de circa 7 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral este de circa 8 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral este de circa 9 mm³. În unele aplicări, fragmentul tumoral este de circa 10 mm³.
10

În unele aplicări, TIL se obțin din digestii tumorale. În unele aplicări, digestiile tumorale s-au generat prin incubare în mediu enzimatic, de exemplu, nelimitativ, RPMI 1640, 2 mM GlutaMAX, 10 mg/mL gentamicină, 30 U/mL DNaza și 1.0 mg/mL colagenază, urmată de disociere mecanică (GenteMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). După așezarea tumorii în mediu enzimatic, tumoarea poate fi disociată mecanic aproximativ 1 minut. Soluția poate fi apoi incubată 30 minute la 37°C în 5% CO₂, după care este fragmentată din nou mecanic aproximativ 1 minut. După reincubare 30 minute la 37°C în 5% CO₂, tumoarea poate fi disociată mecanic o a treia oară aproximativ 1 minut. În unele aplicări, după a treia disociere mecanică, dacă sunt prezente bucăți mari de țesut, se aplică 1 sau 2 disocieri mecanice
20 suplimentare în probă, cu sau fără alte 30 minute de incubare la 37°C în 5% CO₂. În unele aplicări, la sfârșitul incubării finale, dacă suspensia celulară conține un număr mare de globule roșii sau celule moarte, se poate efectua o separare în gradient de densitate folosind Ficoll pentru a îndepărta aceste celule.

În unele aplicări, suspensia celulară recoltată înainte de prima etapă de expansiune este denumită "populație celulară primară" sau populație celulară "proaspăt recoltată".
25

În unele aplicări, celulele pot fi opțional congelate după recoltarea probelor și depozitate înainte de folosire în expansiunea descrisă în etapa B, care este descrisă detaliat mai jos și exemplificată în Figura 27.
30

B. ETAPA B: Prima expansiune

1. TIL tinere

În unele aplicări, metodele din prezenta prevăd obținerea TIL tinere, capabile de cicluri de replicare mărite la administrarea la un subiect/pacient și astfel pot asigura beneficii terapeutice suplimentare față de TIL mai bătrâne (*i.e.*, TIL care au suferit mai multe runde de replicare înainte de administrare la un subiect/pacient). Caracteristicile TIL tinere au fost descrise în literatură, de exemplu, 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); și Tran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008).
35

Diversii receptori antigenici ai limfocitelor T și B se produc prin recombinare somatică a unui număr limitat, dar mare, de segmente genice. Aceste segmente genice: V (variabil), D (diversitate), J (juxtapunere), și C (constant) determină specificitatea de legare și aplicările în aval ale imunoglobulinelor și receptorilor T celulari (TCR). Prezenta invenție prevede o metodă de generare TIL care prezintă și cresc diversitatea repertoriului celulelor T. În unele aplicări, TIL obținute prin metoda din prezenta prezintă o creștere a diversității repertoriului celulelor T. În unele aplicări, TIL obținute prin metoda din prezenta prezintă o creștere a diversității repertoriului celulelor T față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, TIL obținute prin metoda din prezenta prezintă o creștere a diversității repertoriului celulelor T față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind metode denumite procesul 1C, exemplificat în Figura 83. În unele aplicări, TIL obținute în prima expansiune prezintă o creștere a diversității repertoriului celulelor T. În unele aplicări, creșterea diversității este o creștere a diversității imunoglobulinelor și/sau a diversității receptorilor T celulari. În unele aplicări, diversitatea imunoglobulinică este în lanțul greu al imunoglobulinei. În unele aplicări, diversitatea imunoglobulinică este în lanțul ușor al imunoglobulinei. În unele aplicări, diversitatea este în receptorul T celular. În unele aplicări, diversitatea este în unul dintre receptorii T celulari selectați din grupul conștând
40
45
50
55

din receptori alpha, beta, gamma și delta. În unele aplicări, există o creștere a expresiei receptorului T celular (TCR) alpha și/sau beta. În unele aplicări, există o creștere a expresiei receptorului T celular (TCR) alpha. În unele aplicări, există o creștere a expresiei receptorului T celular (TCR) beta. În unele aplicări, există o creștere a expresiei TCRab (*i.e.*, TCR α/β).

5 După disecția sau digestia fragmentelor tumorale, de exemplu așa cum se descrie în etapa A din Figura 27, celulele rezultate sunt cultivate în ser conținând IL-2 în condiții care favorizează creșterea TIL față de celule tumorale și de alt tip. În unele aplicări, digestiile tumorale sunt incubate în godeuri de 2 mL în mediu cuprinzând ser AB uman inactivat cu 6000 IU/mL IL-2. Această populație celulară primară este cultivată o perioadă de zile, în general de la 3 la 14 zile, producând o populație TIL în masă, în general
10 circa 1×10^8 celule TIL în masă. Această populație celulară primară poate fi cultivată o perioadă de 7 până la 14 zile, producând o populație TIL în masă, în general circa 1×10^8 celule TIL în masă. Alternativ, această populație celulară primară este cultivată o perioadă de 10 până la 14 zile, producând o populație TIL în masă, în general circa 1×10^8 celule TIL în masă. În unele aplicări, această populație celulară primară este cultivată o perioadă de circa 11 zile, producând o populație TIL în masă, în general circa 1×10^8 celule
15 TIL în masă.

Într-o aplicare preferată, expansiunea TIL se poate efectua folosind o etapă inițială de expansiune TIL în masă (de exemplu așa cum se descrie în etapa B din Figura 27, care poate include procese denumite pre-REP) descrisă mai jos și în prezenta, urmată de o a doua expansiune (Etapa D, incluzând procese denumite etape ale protocolului de expansiune rapidă (REP)) descrisă mai jos la Etapa D și în prezenta, urmată de crioconservare opțională și urmată de o a doua Etapă D (incluzând procese denumite etape REP de restimulare) descrisă mai jos și în prezenta. TIL obținute din acest proces pot fi opțional caracterizate cu privire la caracteristicile fenotipice și parametrii metabolici descriși în prezenta.

În aplicări în care culturile TIL sunt inițiate în plăci cu 24 de godeuri, de exemplu, folosind placa de cultură celulară Costar, cu 24 de godeuri, cu fund plat (Corning Incorporated, Corning, NY), fiecare godeu poate fi înșămânțat cu 1×10^6 celule tumorale digerare sau un fragment tumoral în 2 mL de mediu complet (CM) cu IL-2 (6000 IU/mL; Chiron Corp., Emeryville, CA). În unele aplicări, fragmentul tumoral are între circa 1 mm^3 și 10 mm^3 .

În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni este denumit "CM", o abreviere pentru mediu de cultură. În unele aplicări, CM pentru Etapa B constă din RPMI 1640 cu GlutaMAX, suplimentat cu 10% ser AB uman, 25 mM Hepes și 10 mg/mL gentamicină. În aplicări în care culturile sunt inițiate în baloane permeabile la gaz cu o capacitate de 40 mL și un fund de siliciu permeabil la gaz de 10 cm^2 (de exemplu, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Fig. 1), s-au introdus în fiecare balon $10\text{-}40 \times 10^6$ celule tumorale digerare viabile sau 5-30 fragmente tumorale în $10\text{-}40 \text{ mL}$ de CM cu IL-2. Atât G-Rex10, cât și plăcile cu 24 de godeuri s-au incubat într-un incubator umidificat la 37°C în 5% CO_2 și, la 5 zile după inițierea culturii, jumătate din mediu s-a îndepărtat și s-a înlocuit cu CM și IL-2 proaspăt și, după ziua 5, jumătate din mediu s-a schimbat la fiecare 2-3 zile.

După prepararea fragmentelor tumorale, celulele rezultate (*i.e.*, fragmente) sunt cultivate în ser conținând IL-2 în condiții care favorizează creșterea TIL față de celule tumorale și de alt tip. În unele aplicări, digestiile tumorale sunt incubate în godeuri de 2 mL în mediu cuprinzând ser AB uman inactivat (sau, în unele cazuri, așa cum se indică în prezenta, în prezența unei populații celulare aAPC) cu 6000 IU/mL de IL-2. Această populație celulară primară este cultivată o perioadă de zile, în general de la 10 la 14 zile, producând o populație TIL în masă, în general circa 1×10^8 celule TIL în masă. În unele aplicări, mediul de creștere în prima expansiune cuprinde IL-2 sau o variantă a acesteia. În unele aplicări, IL este IL-2 umană recombinantă (rhIL-2). În unele aplicări soluția de bază IL-2 are o activitate specifică de $20\text{-}30 \times 10^6$ IU/mg pentru o fiolă de 1 mg. În unele aplicări soluția de bază IL-2 are o activitate specifică de 20×10^6 IU/mg pentru o fiolă de 1 mg. În unele aplicări soluția de bază IL-2 are o activitate specifică de 25×10^6 IU/mg pentru o fiolă de 1 mg. În unele aplicări soluția de bază IL-2 are o activitate specifică de 30×10^6 IU/mg pentru o fiolă de 1 mg. În unele aplicări, soluția de bază IL-2 are o concentrație finală de $4\text{-}8 \times 10^6$ IU/mg de IL-2. În unele aplicări, soluția de bază IL-2 are o concentrație finală de $5\text{-}7 \times 10^6$ IU/mg de IL-2. În unele aplicări, soluția de bază IL-2 are o concentrație finală de 6×10^6 IU/mg de IL-2. În unele aplicări, soluția de bază IL-2 se prepară așa cum se descrie în exemplul 4. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 10.000 IU/mL de IL-2, circa 9.000 IU/mL de IL-2, circa 8.000 IU/mL de IL-2, circa 7.000 IU/mL de IL-2, circa 6000 IU/mL de IL-2 sau circa 5.000 IU/mL de IL-2. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 9.000 IU/mL de IL-2 până la circa 5.000 IU/mL de IL-2. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 8.000 IU/mL de IL-2 până la circa 6.000 IU/mL de IL-2. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 7.000 IU/mL de IL-2 până la circa 6.000 IU/mL de IL-2. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 6.000 IU/mL de IL-2. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară mai cuprinde IL-2. În unele aplicări, mediul de cultură celulară cuprinde circa 3000 IU/mL de IL-2. Într-o aplicare,

mediul de cultură celulară mai cuprinde IL-2. Într-o aplicare preferată, mediul de cultură celulară cuprinde circa 3000 IU/mL de IL-2. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară cuprinde circa 1000 IU/mL, circa 1500 IU/mL, circa 2000 IU/mL, circa 2500 IU/mL, circa 3000 IU/mL, circa 3500 IU/mL, circa 4000 IU/mL, circa 4500 IU/mL, circa 5000 IU/mL, circa 5500 IU/mL, circa 6000 IU/mL, circa 6500 IU/mL, circa 7000 IU/mL, circa 7500 IU/mL sau circa 8000 IU/mL de IL-2. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară cuprinde între 1000 și 2000 IU/mL, între 2000 și 3000 IU/mL, între 3000 și 4000 IU/mL, între 4000 și 5000 IU/mL, între 5000 și 6000 IU/mL, între 6000 și 7000 IU/mL, între 7000 și 8000 IU/mL sau circa 8000 IU/mL de IL-2.

În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 500 IU/mL IL-15, circa 400 IU/mL IL-15, circa 300 IU/mL IL-15, circa 200 IU/mL IL-15, circa 180 IU/mL IL-15, circa 160 IU/mL IL-15, circa 140 IU/mL IL-15, circa 120 IU/mL IL-15 sau circa 100 IU/mL IL-15. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 500 IU/mL IL-15 până la circa 100 IU/mL IL-15. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 400 IU/mL IL-15 până la circa 100 IU/mL IL-15. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 300 IU/mL IL-15 până la circa 100 IU/mL IL-15. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 200 IU/mL IL-15. În unele aplicări, mediul de cultură celulară cuprinde circa 180 IU/mL IL-15. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară cuprinde circa 180 IU/mL IL-15.

În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 20 IU/mL de IL-21, circa 15 IU/mL de IL-21, circa 12 IU/mL de IL-21, circa 10 IU/mL de IL-21, circa 5 IU/mL de IL-21, circa 4 IU/mL de IL-21, circa 3 IU/mL de IL-21, circa 2 IU/mL de IL-21, circa 1 IU/mL de IL-21 sau circa 0.5 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 20 IU/mL de IL-21 până la circa 0.5 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 15 IU/mL de IL-21 până la circa 0.5 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 12 IU/mL de IL-21 până la circa 0.5 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 10 IU/mL de IL-21 până la circa 0.5 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 5 IU/mL de IL-21 până la circa 1 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni cuprinde circa 2 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură celulară cuprinde circa 1 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură celulară cuprinde circa 0.5 IU/mL de IL-21. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară mai cuprinde IL-21. Într-o aplicare preferată, mediul de cultură celulară cuprinde circa 1 IU/mL de IL-21.

În unele aplicări, mediul de cultură al primei expansiuni este denumit "CM", o abreviere pentru mediu de cultură. În unele aplicări, este denumit CM1 (mediu de cultură 1). În unele aplicări, CM constă din RPMI 1640 cu GlutaMAX, suplimentat cu 10% ser AB uman, 25 mM Hepes și 10 mg/mL gentamicină. În aplicări în care culturile sunt inițiate în baloane permeabile la gaz cu o capacitate de 40 mL și un fund de siliciu permeabil la gaz de 10cm² (de exemplu, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Fig. 1), se introduc în fiecare balon 10-40x 10⁶ celule tumorale digerabile viabile sau 5-30 fragmente tumorale în 10-40mL de CM cu IL-2. Atât G-Rex10, cât și plăcile cu 24 de godeuri s-au incubat într-un incubator umidificat la 37°C în 5% CO₂ și, la 5 zile după inițierea culturii, jumătate din mediu s-a îndepărtat și s-a înlocuit cu CM și IL-2 proaspăt și, după ziua 5, jumătate din mediu s-a schimbat la fiecare 2-3 zile. În unele aplicări, CM este CM1 descris în exemple, vezi Exemplul 5. În unele aplicări, prima expansiune are loc într-un mediu de cultură celulară inițial sau un prim mediu de cultură celulară. În unele aplicări, mediul de cultură celulară inițial sau primul mediu de cultură celulară cuprinde IL-2.

Prima expansiune (incluzând procese precum cele descrise de exemplu în etapa B din Figura 27, care le pot include pe cele denumite uneori pre-REP) poate fi scurtată la 3-14 zile, așa cum se discută în exemple și figuri. Prima expansiune (incluzând procese precum cele descrise de exemplu în etapa B din Figura 27, care le pot include pe cele denumite uneori pre-REP) poate fi scurtată la 7 - 14 zile, așa cum se discută în exemple și se reprezintă în Figurile 4 și 5, incluzând de asemenea, de exemplu, o expansiune descrisă în etapa B din Figura 27. Prima expansiune din Etapa B poate fi scurtată la 10-14 zile, așa cum se discută în exemple și se reprezintă în Figurile 4 și 5. În unele aplicări, prima expansiune este scurtată la 11 zile, așa cum se discută în exemple și se reprezintă în Figurile 4 și 5, incluzând de asemenea, de exemplu, o expansiune descrisă în etapa B din Figura 27.

Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 1 zi, 2 zile, 3 zile, 4 zile, 5 zile, 6 zile, 7 zile, 8 zile, 9 zile, 10 zile, 11 zile, 12 zile, 13 zile sau 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 1 zi până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 2 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 3 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 4 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 5 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 6 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 7 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 8 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se

poate efectua timp de 9 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 10 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 11 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 12 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 13 zile până la 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 14 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 1 zi până la 11 zile. Prima expansiune TIL se poate efectua timp de 2 zile până la 11 zile. În unele aplicări, prima expansiune TIL se poate efectua timp de 3 zile până la 11 zile. În unele aplicări, prima expansiune TIL se poate efectua timp de 4 zile până la 11 zile. În unele aplicări, prima expansiune TIL se poate efectua timp de 5 zile până la 11 zile. În unele aplicări, prima expansiune TIL se poate efectua timp de 6 zile până la 11 zile. În unele aplicări, prima expansiune TIL se poate efectua timp de 7 zile până la 11 zile. În unele aplicări, prima expansiune TIL se poate efectua timp de 8 zile până la 11 zile. În unele aplicări, prima expansiune TIL se poate efectua timp de 9 zile până la 11 zile. În unele aplicări, prima expansiune TIL se poate efectua timp de 10 zile până la 11 zile. În unele aplicări, prima expansiune TIL se poate efectua timp de 11 zile.

În unele aplicări, se utilizează o combinație de IL-2, IL-7, IL-15 și/sau IL-21 ca o combinație în prima expansiune. În unele aplicări, IL-2, IL-7, IL-15 și/sau IL-21, precum și orice combinații ale acestora pot fi incluse în prima expansiune, inclusiv de exemplu în procesele unei Etape B conform Figurii 27, descrise în prezenta. În unele aplicări, se utilizează o combinație de IL-2, IL-15 și IL-21 ca o combinație în prima expansiune. În unele aplicări, IL-2, IL-15 și IL-21, precum și orice combinații ale acestora pot fi incluse în procesele Etapei B din Figura 27 și descrise în prezenta.

Prima expansiune (incluzând procese denumite pre-REP; de exemplu, Etapa B din Figura 27) poate fi scurtată la 3 - 14 zile, așa cum se discută în exemple și figuri. Prima expansiune din Etapa B poate fi scurtată la 7 - 14 zile, așa cum se discută în exemple și se reprezintă în Figurile 4 și 5. Prima expansiune din Etapa B poate fi scurtată la 10 - 14 zile, așa cum se discută în exemple și se reprezintă în Figurile 4, 5 și 27. În unele aplicări, prima expansiune este scurtată la 11 zile, așa cum se discută în exemple și se reprezintă în Figurile 4, 5, și 27.

În unele aplicări, prima expansiune, de exemplu, Etapa B din Figura 27, se efectuează într-un bioreactor în sistem închis. În unele aplicări, se utilizează un sistem închis pentru expansiunea TIL, așa cum se descrie în prezenta. În unele aplicări, se utilizează un singur bioreactor. În unele aplicări, bioreactorul unic folosit este de exemplu G-REX -10 sau G-REX -100. În unele aplicări, bioreactorul în sistem închis este un singur bioreactor.

C. ETAPA C: Tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune

În unele cazuri, populația TIL în masă obținută din prima expansiune, inclusiv de exemplu populația TIL obținută de exemplu din Etapa B, așa cum se indică în Figura 27, poate fi crioconservată imediat, folosind protocoalele discutate în prezenta mai jos. Alternativ, populația TIL obținută din prima expansiune, denumită a doua populație TIL, poate fi supusă unei a doua expansiuni (care poate include expansiuni denumite uneori REP) și apoi crioconservată așa cum se discută mai jos. În mod similar, în cazul în care se vor folosi TIL modificate genetic în terapie, prima populație TIL (denumită uneori populația TIL în masă) sau a doua populație TIL (care poate include în unele aplicări populații denumite populații REP TIL) poate fi supusă modificărilor genetice pentru tratamente adecvate înainte de expansiune sau după prima expansiune și înainte de a doua expansiune.

În unele aplicări, TIL obținute din prima expansiune (de exemplu, din etapa B așa cum se indică în Figura 27) sunt depozitate până la obținerea fenotipului pentru selecție. În unele aplicări, TIL obținute din prima expansiune (de exemplu, din etapa B așa cum se indică în Figura 27) nu sunt depozitate și sunt utilizate direct în a doua expansiune. În unele aplicări, TIL obținute din prima expansiune nu sunt crioconservate după prima expansiune și înainte de a doua expansiune. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la circa 3 zile, 4 zile, 5 zile, 6 zile, 7 zile, 8 zile, 9 zile, 10 zile, 11 zile, 12 zile, 13 zile sau 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la circa 3 zile până la 14 zile de la fragmentare. Tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la circa 4 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la circa 4 zile până la 10 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la circa 7 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la circa 14 zile de la fragmentare.

În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 1 zi, 2 zile, 3 zile, 4 zile, 5 zile, 6 zile, 7 zile, 8 zile, 9 zile, 10 zile, 11 zile, 12 zile, 13 zile sau 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc 1 zi până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, prima expansiune TIL se poate efectua timp de 2 zile până la 14 zile. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 3 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 4 zile până

la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 5 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 6 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 7 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 8 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 9 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 10 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 11 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 12 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 13 zile până la 14 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 1 zi până la 11 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 2 zile până la 11 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 3 zile până la 11 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 4 zile până la 11 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 5 zile până la 11 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 6 zile până la 11 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 7 zile până la 11 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 8 zile până la 11 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 9 zile până la 11 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 10 zile până la 11 zile de la fragmentare. În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune are loc la 11 zile de la fragmentare.

În unele aplicări, TIL nu sunt depozitate după prima expansiune și înainte de a doua expansiune și TIL sunt utilizate direct în a doua expansiune (de exemplu, în unele aplicări, nu există depozitare în timpul tranziției de la etapa B la etapa D așa cum se indică în Figura 27). În unele aplicări, tranziția are loc în sistem închis, descris în prezenta. În unele aplicări, TIL din prima expansiune, a doua populație de TIL, se utilizează direct în a doua expansiune fără perioadă de tranziție.

În unele aplicări, tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune, de exemplu, Etapa C din Figura 27, se efectuează într-un bioreactor în sistem închis. În unele aplicări, se utilizează un sistem închis pentru expansiunea TIL, așa cum se descrie în prezenta. În unele aplicări, se utilizează un singur bioreactor. În unele aplicări, bioreactorul unic folosit este de exemplu G-REX -10 sau G-REX -100. În unele aplicări, bioreactorul în sistem închis este un singur bioreactor.

D. ETAPA D: A doua expansiune

În unele aplicări, populația celulară TIL este amplificată în număr după recoltare și procesarea inițială în masă, de exemplu, după Etapa A și Etapa B, și tranziția indicată ca etapa C, așa cum se indică în Figura 27). Această expansiune suplimentară este denumită în prezenta a doua expansiune, care poate include procese de expansiune denumite în general în domeniu proces de expansiune rapidă (REP; precum și procese indicate în etapa D din Figura 27). A doua expansiune se realizează în general folosind un mediu de cultură cuprinzând mai multe componente, inclusiv celule feeder, o sursă de citokine și un anticorp anti-CD3, într-un recipient permeabil la gaz.

În unele aplicări, a doua expansiune sau a doua expansiune TIL (care poate include expansiuni denumite uneori REP; precum și procese indicate în etapa D din Figura 27) se poate efectua folosind orice baloane sau recipiente TIL cunoscute în domeniu. În unele aplicări, a doua expansiune TIL se poate efectua timp de 7 zile, 8 zile, 9 zile, 10 zile, 11 zile. A doua expansiune TIL se poate efectua timp de 12 zile, 13 zile sau 14 zile. A doua expansiune TIL se poate efectua timp de circa 7 zile până la circa 14 zile. A doua expansiune TIL se poate efectua timp de circa 8 zile până la circa 14 zile. A doua expansiune TIL se poate efectua timp de circa 9 zile până la circa 14 zile. A doua expansiune TIL se poate efectua timp de circa 10 zile până la circa 14 zile. A doua expansiune TIL se poate efectua timp de circa 11 zile până la circa 14 zile. A doua expansiune TIL se poate efectua timp de circa 12 zile până la circa 14 zile. A doua expansiune TIL se poate efectua timp de circa 13 zile până la circa 14 zile. A doua expansiune TIL se poate efectua timp de circa 14 zile.

Într-o aplicare, a doua expansiune se poate efectua într-un recipient permeabil la gaz folosind metode din prezenta invenție (inclusiv de exemplu expansiuni denumite REP; precum și procese indicate în etapa D din Figura 27). De exemplu, TIL pot fi amplificate rapid folosind stimulare nespecifică a receptorului T celular în prezența interleukinei-2 (IL-2) sau interleukinei-15 (IL-15). Stimulul nespecific al receptorului T celular poate include, de exemplu, un anticorp anti-CD3, cum ar fi circa 30 ng/ml de OKT3,

un anticorp anti-CD3 monoclonal murin (disponibil în comerț de la Ortho-McNeil, Raritan, NJ sau Miltenyi Biotech, Auburn, CA) sau UHCT-1 (disponibil în comerț de la BioLegend, San Diego, CA, USA). TIL pot fi amplificate pentru a induce stimulare suplimentară a TIL *in vitro* incluzând unul sau mai multe antigene în a doua expansiune, inclusiv porțiuni antigenice ale acestora, cum ar fi epitop(i), de cancer, care pot fi opțional exprimate dintr-un vector, cum ar fi o peptidă de legare a antigenului leucocitar uman A2 (HLA-A2), *de ex.*, 0.3 μ M MART-1 :26-35 (27 L) sau gpl 00:209-217 (210M), opțional în prezența unui factor de creștere a celulelor T, cum ar fi 300 IU/mL IL-2 sau IL-15. Alte antigene adecvate pot include, *de ex.*, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antigen canceros de tirozinază, MAGE-A3, SSX-2 și VEGFR2 sau porțiuni antigenice ale acestora. TIL pot fi de asemenea amplificate rapid prin re-stimulare cu aceleași antigene ale cancerului încărcate pe celule de prezentare a antigenului care exprimă HLA-A2. Alternativ, TIL pot fi re-stimulate suplimentar, *de ex.*, cu limfocite autologe, iradiate, sau cu limfocite alogene iradiate HLA-A2+ și IL-2. În unele aplicări, re-stimularea are loc ca parte din a doua expansiune. În unele aplicări, a doua expansiune are loc în prezența limfocitelor autologe iradiate sau cu limfocite alogene iradiate HLA-A2+ și IL-2.

Într-o aplicare, mediul de cultură celulară mai cuprinde IL-2. În unele aplicări, mediul de cultură celulară cuprinde circa 3000 IU/mL de IL-2. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară cuprinde circa 1000 IU/mL, circa 1500 IU/mL, circa 2000 IU/mL, circa 2500 IU/mL, circa 3000 IU/mL, circa 3500 IU/mL, circa 4000 IU/mL, circa 4500 IU/mL, circa 5000 IU/mL, circa 5500 IU/mL, circa 6000 IU/mL, circa 6500 IU/mL, circa 7000 IU/mL, circa 7500 IU/mL sau circa 8000 IU/mL de IL-2. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară cuprinde între 1000 și 2000 IU/mL, între 2000 și 3000 IU/mL, între 3000 și 4000 IU/mL, între 4000 și 5000 IU/mL, între 5000 și 6000 IU/mL, între 6000 și 7000 IU/mL, între 7000 și 8000 IU/mL sau între 8000 IU/mL de IL-2.

Într-o aplicare, mediul de cultură celulară cuprinde anticorp OKT3. În unele aplicări, mediul de cultură celulară cuprinde circa 30 ng/mL de anticorp OKT3. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară cuprinde circa 0.1 ng/mL, circa 0.5 ng/mL, circa 1 ng/mL, circa 2.5 ng/mL, circa 5 ng/mL, circa 7.5 ng/mL, circa 10 ng/mL, circa 15 ng/mL, circa 20 ng/mL, circa 25 ng/mL, circa 30 ng/mL, circa 35 ng/mL, circa 40 ng/mL, circa 50 ng/mL, circa 60 ng/mL, circa 70 ng/mL, circa 80 ng/mL, circa 90 ng/mL, circa 100 ng/mL, circa 200 ng/mL, circa 500 ng/mL și circa 1 μ g/mL de anticorp OKT3. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară cuprinde între 0.1 ng/mL și 1 ng/mL, între 1 ng/mL și 5 ng/mL, între 5 ng/mL și 10 ng/mL, între 10 ng/mL și 20 ng/mL, între 20 ng/mL și 30 ng/mL, între 30 ng/mL și 40 ng/mL, între 40 ng/mL și 50 ng/mL și între 50 ng/mL și 100 ng/mL de anticorp OKT3.

În unele aplicări, se utilizează o combinație de IL-2, IL-7, IL-15 și/sau IL-21 ca o combinație în a doua expansiune. În unele aplicări, IL-2, IL-7, IL-15 și/sau IL-21, precum și orice combinații ale acestora pot fi incluse în a doua expansiune, inclusiv de exemplu în procesele unei Etape D din Figura 27, descrise în prezenta. În unele aplicări, se poate utiliza o combinație de IL-2, IL-15 și IL-21 ca o combinație în a doua expansiune. În unele aplicări, IL-2, IL-15 și IL-21, precum și orice combinații ale acestora pot fi incluse în procesele Etapei D din Figura 27, descrise în prezenta.

În unele aplicări, a doua expansiune se poate efectua într-un mediu de cultură celulară suplimentat cuprinzând IL-2, OKT-3 și celule feeder de prezentare a antigenului. În unele aplicări, a doua expansiune are loc într-un mediu de cultură celulară suplimentat. În unele aplicări, mediul de cultură celulară suplimentat cuprinde IL-2, OKT-3 și celule feeder de prezentare a antigenului. În unele aplicări, al doilea mediu de cultură celulară cuprinde IL-2, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC; denumite și celule feeder de prezentare a antigenului). În unele aplicări, a doua expansiune are loc într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2, OKT-3 și celule feeder de prezentare a antigenului (*i.e.*, celule de prezentare a antigenului).

În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 500 IU/mL IL-15, circa 400 IU/mL IL-15, circa 300 IU/mL IL-15, circa 200 IU/mL IL-15, circa 180 IU/mL IL-15, circa 160 IU/mL IL-15, circa 140 IU/mL IL-15, circa 120 IU/mL IL-15 sau circa 100 IU/mL IL-15. În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 500 IU/mL IL-15 până la circa 100 IU/mL IL-15. În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 400 IU/mL IL-15 până la circa 100 IU/mL IL-15. În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 300 IU/mL IL-15 până la circa 100 IU/mL IL-15. În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 200 IU/mL IL-15. În unele aplicări, mediul de cultură celulară cuprinde circa 180 IU/mL IL-15. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară mai cuprinde IL-15. Într-o aplicare preferată, mediul de cultură celulară cuprinde circa 180 IU/mL IL-15.

În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 20 IU/mL de IL-21, circa 15 IU/mL de IL-21, circa 12 IU/mL de IL-21, circa 10 IU/mL de IL-21, circa 5 IU/mL de IL-21, circa 4 IU/mL de IL-21, circa 3 IU/mL de IL-21, circa 2 IU/mL de IL-21, circa 1 IU/mL de IL-21 sau circa 0.5 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 20

IU/mL de IL-21 până la circa 0.5 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 15 IU/mL de IL-21 până la circa 0.5 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 12 IU/mL de IL-21 până la circa 0.5 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 10 IU/mL de IL-21 până la circa 0.5 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 5 IU/mL de IL-21 până la circa 1 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni cuprinde circa 2 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură celulară cuprinde circa 1 IU/mL de IL-21. În unele aplicări, mediul de cultură celulară cuprinde circa 0.5 IU/mL de IL-21. Într-o aplicare, mediul de cultură celulară mai cuprinde IL-21. Într-o aplicare preferată, mediul de cultură celulară cuprinde circa 1 IU/mL de IL-21.

În unele aplicări, celulele feeder de prezentare a antigenului (APC) sunt PBMC. Într-o aplicare, raportul dintre TIL și PBMC și/sau celulele de prezentare a antigenului în expansiunea rapidă și/sau a doua expansiune este circa 1 până la 25, circa 1 până la 50, circa 1 până la 100, circa 1 până la 125, circa 1 până la 150, circa 1 până la 175, circa 1 până la 200, circa 1 până la 225, circa 1 până la 250, circa 1 până la 275, circa 1 până la 300, circa 1 până la 325, circa 1 până la 350, circa 1 până la 375, circa 1 până la 400 sau circa 1 până la 500. Într-o aplicare, raportul dintre TIL și PBMC în expansiunea rapidă și/sau a doua expansiune este între 1 până la 50 și 1 până la 300. Într-o aplicare, raportul dintre TIL și PBMC în expansiunea rapidă și/sau a doua expansiune este între 1 până la 100 și 1 până la 200.

Într-o aplicare, REP și/sau a doua expansiune se efectuează în baloane cu TIL în masă amestecate cu un excedent de 100 sau 200 de ori de celule feeder inactivate, 30 mg/mL anticorp anti-CD3 OKT3 și 3000 IU/mL IL-2 în 150 ml de mediu. Mediul se înlocuiește (în general înlocuire de mediu 2/3 media prin respirație cu mediu proaspăt) până la transferul celulelor într-o cameră de creștere alternativă. Camerele de creștere alternative includ baloane și recipiente permeabile la gaz G-REX discutate detaliat mai jos.

A doua expansiune (care poate include procese denumite REP) poate fi scurtată la 7-14 zile, așa cum se discută în exemple și figuri. În unele aplicări, a doua expansiune este scurtată la 11 zile.

Într-o aplicare, REP și/sau a doua expansiune se poate efectua folosind baloane și recipiente permeabile la gaz T-175 descrise anterior (Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42) sau vase de cultură permeabile la gaz (baloane G-Rex). În unele aplicări, a doua expansiune (inclusiv expansiuni denumite expansiuni rapide) se efectuează în baloane T-175 și se pot adăuga circa 1×10^6 TIL suspendate în 150 mL de mediu în fiecare balon T-175. TIL pot fi cultivate într-un amestec de 1 până la 1 mediu CM și AIM-V, suplimentat cu 3000 IU per mL IL-2 și 30 ng per ml anti-CD3. Baloanele T-175 pot fi incubate la 37°C în 5% CO₂. Jumătate din mediu poate fi schimbat în ziua 5 folosind 50/50 mediu cu 3000 IU per mL de IL-2. În unele aplicări, în ziua 7, celulele din două baloane T-175 pot fi combinate într-un recipient de 3 L și s-au adăugat 300 mL AIM V cu 5% ser AB uman și 3000 IU per mL IL-2 în suspensia TIL de 300 ml. S-au numărat celulele din fiecare recipient în fiecare zi sau la fiecare două zile și s-a adăugat mediu proaspăt pentru a menține numărul celulelor între 0.5 și 2.0×10^6 celule/mL.

Într-o aplicare, a doua expansiune (care poate include expansiuni denumite REP, precum și cele indicate în etapa D din Figura 27) se poate efectua în baloane permeabile la gaz cu capacitate de 500 mL, cu fund de siliciu permeabil la gaz de 100 cm (G-Rex 100, disponibil în comerț de la Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA), 5×10^6 sau 10×10^6 TIL pot fi cultivate cu PBMC în 400 mL de mediu 50/50, suplimentat cu 5% ser AB uman, 3000 IU per mL de IL-2 și 30 ng per ml de anti-CD3 (OKT3). Baloanele G-Rex 100 pot fi incubate la 37°C în 5% CO₂. În ziua 5, 250 mL de supernatant poate fi îndepărtat și introdus în flacoane de centrifugă și centrifugat la 1500 rpm ($491 \times g$) 10 minute. Peletele TIL pot fi re-suspendate cu 150 mL de mediu proaspăt cu 5% ser AB uman, 3000 IU per mL de IL-2 și s-au adăugat înapoi în baloanele G-Rex 100 inițiale. Când TIL sunt amplificate în serie în baloane G-Rex 100, în ziua 7, TIL din fiecare G-Rex 100 pot fi suspendate în 300 mL de mediu prezent în fiecare balon și suspensia celulară poate fi împărțită în 3 părți alicote de 100 mL care se pot folosi pentru însămânțarea a 3 baloane G-Rex 100. Se pot adăuga apoi 150 mL de AIM-V cu 5% ser AB uman și 3000 IU per mL de IL-2 în fiecare balon. Baloanele G-Rex 100 pot fi incubate la 37°C în 5% CO₂ și după 4 zile se pot adăuga 150 mL de AIM-V cu 3000 IU per mL de IL-2 în fiecare balon G-REX 100. Celulele pot fi recoltate în ziua 14 de cultură.

Într-o aplicare, a doua expansiune (incluzând expansiuni denumite REP) se efectuează în baloane cu TIL în masă amestecate cu un excedent de 100 sau 200 de ori de celule feeder inactivate, 30 mg/mL anticorp anti-CD3 OKT3 și 3000 IU/mL IL-2 în 150 ml de mediu. În unele aplicări, mediul se înlocuiește până la transferul celulelor într-o cameră de creștere alternativă. În unele aplicări, se înlocuiesc 2/3 din mediu prin respirație cu mediu proaspăt. În unele aplicări, camerele de creștere alternative includ baloane și recipiente permeabile la gaz G-REX discutate detaliat mai jos.

Într-o aplicare, se efectuează a doua expansiune (incluzând expansiuni denumite REP) și mai cuprinde o etapă în care TIL sunt selectate pentru reactivitate superioară la tumoare. Se poate folosi orice metodă de selecție cunoscută în domeniu. De exemplu, se pot folosi metodele descrise în documentația cererii de brevet U.S. nr. 2016/0010058 A1 pentru selecția TIL cu reactivitate tumorală superioară.

5 Opțional, se poate efectua un test de viabilitate celulară după a doua expansiune (incluzând expansiuni denumite REP), folosind teste standard cunoscute în domeniu. De exemplu, se poate efectua un test de excludere cu albastru tripan pe o probă de TIL în masă, care marchează selectiv celulele moarte și permite o evaluare a viabilității. În unele aplicări, probele TIL pot fi numărate și viabilitatea se determină folosind un aparat de numărare automat Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). În unele
10 aplicări, viabilitatea se determină conform protocolului Cellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counter descris, de exemplu, în Exemplul 15.

În unele aplicări, a doua expansiune (incluzând expansiuni denumite REP) a TIL se poate efectua folosind baloane și recipiente permeabile la gaz T-175 descrise anterior (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751 și Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J
15 Immunother., 26:332-342) sau baloane permeabile la gaz G-Rex. În unele aplicări, a doua expansiune se efectuează folosind baloane. În unele aplicări, a doua expansiune se efectuează folosind baloane permeabile la gaz G-Rex. În unele aplicări, a doua expansiune se efectuează în baloane T-175 și se suspendă circa 1×10^6 TIL în circa 150 mL de mediu, care se adaugă în fiecare balon T-175. TIL sunt cultivate cu PBMC alogenice iradiate (50 Gy) ca celule "feeder" la un raport de 1 până la 100 și celulele s-au cultivat într-un
20 amestec de 1 până la 1 de mediu CM și AIM-V (mediu 50/50), suplimentat cu 3000 IU/mL de IL-2 și 30 ng/mL anti-CD3. Baloanele T-175 sunt incubate la 37°C în 5% CO₂. În unele aplicări, jumătate din mediu se schimbă în ziua 5 folosind 50/50 mediu cu 3000 IU/mL de IL-2. În unele aplicări, în ziua 7, celulele din 2 baloane T-175 se combină într-un recipient de 3 L bag și se adaugă 300 mL de AIM-V cu 5% ser AB uman și 3000 IU/mL de IL-2 în 300 mL de suspensie TIL. Celulele din fiecare recipient pot fi numărate în
25 fiecare zi sau la două zile și se poate adăuga mediu proaspăt pentru a menține numărul celulelor între circa 0.5 și circa 2.0×10^6 celule/mL.

În unele aplicări, a doua expansiune (incluzând expansiuni denumite REP) se efectuează în baloane cu capacitate de 500 mL cu fund de siliciu permeabil la gaz de 100 cm² (G-Rex 100, Wilson Wolf) (Fig. 1), circa 5×10^6 sau 10×10^6 TIL sunt cultivate cu PBMC alogenice iradiate la un raport de 1 până la 100 în
30 400 mL de mediu 50/50, suplimentat cu 3000 IU/mL de IL-2 și 30 ng/mL de anti-CD3. Baloanele G-Rex 100 sunt incubate la 37°C în 5% CO₂. În unele aplicări, în ziua 5, se îndepărtează 250 mL de supernatant și se introduc în flacoane de centrifugă, centrifugat la 1500 rpm (491g) 10 minute. Peletele TIL pot fi resuspendate apoi cu 150 mL de mediu 50/50 proaspăt cu 3000 IU/mL de IL-2 și se adaugă înapoi în baloanele G-Rex 100 inițiale. În aplicări în care TIL sunt amplificate în serie în baloane G-Rex 100, în ziua
35 7, TIL din fiecare G-Rex 100 sunt suspendate în 300 mL de mediu prezent în fiecare balon și suspensia celulară s-a împărțit în trei părți alicote de 100 mL care se folosesc pentru însămânțarea a 3 baloane G-Rex 100. Se adaugă apoi 150 mL de AIM-V cu 5% ser AB uman și 3000 IU/mL de IL-2 în fiecare balon. Baloanele G-Rex 100 sunt incubate la 37°C în 5% CO₂ și, după 4 zile, se adaugă 150 mL de AIM-V cu 3000 IU/mL de IL-2 în fiecare balon G-Rex 100. Celulele sunt recoltate în ziua 14 de cultură.

40 Diversii receptori antigenici ai limfocitelor T și B se produc prin recombinare somatică a unui număr limitat, dar mare, de segmente genice. Aceste segmente genice: V (variabil), D (diversitate), J (juxtapunere) și C (constant) determină specificitatea legării și aplicările în aval ale imunoglobulinelor și receptorilor T celulari (TCR). Prezenta invenție prevede o metodă de generare a TIL care prezintă și cresc
45 diversitatea repertoriului celulelor T. În unele aplicări, TIL obținute prin metoda din prezenta prezintă o creștere a diversității repertoriului celulelor T. În unele aplicări, TIL obținute în a doua expansiune prezintă o creștere a diversității repertoriului celulelor T. În unele aplicări, creșterea diversității este o creștere a diversității imunoglobulinelor și/sau a diversității receptorilor T celulari. În unele aplicări, diversitatea imunoglobulinică este în lanțul greu al imunoglobulinei. În unele aplicări, diversitatea imunoglobulinică este în lanțul ușor al imunoglobulinei. În unele aplicări, diversitatea este în receptorul T celular. În unele
50 aplicări, diversitatea este în unul dintre receptorii T celulari selectați din grupul constând din receptori alpha, beta, gamma și delta. În unele aplicări, există o creștere a expresiei receptorului T celular (TCR) alpha și/sau beta. În unele aplicări, există o creștere a expresiei receptorului T celular (TCR) alpha. În unele aplicări, există o creștere a expresiei receptorului T celular (TCR) beta. În unele aplicări, există o creștere a expresiei TCRab (*i.e.*, TCR α/β).

55 În unele aplicări, mediul de cultură al celei de-a doua expansiuni (*de ex.*, denumit uneori CM2 sau al doilea mediu de cultură celulară) cuprinde IL-2, OKT-3, precum și celule feeder de prezentare a antigenului (APC), așa cum se discută detaliat mai jos.

În unele aplicări, a doua expansiune, de exemplu, Etapa D din Figura 27, se efectuează într-un bioreactor în sistem închis. În unele aplicări, se utilizează un sistem închis pentru expansiunea TIL, descris

în prezenta. În unele aplicări, se utilizează un singur bioreactor. În unele aplicări, bioreactorul unic folosit este de exemplu G-REX -10 sau G-REX -100. În unele aplicări, bioreactorul în sistem închis este un singur bioreactor.

1. Celule feeder și celule de prezentare a antigenului

5 Într-o aplicare, procedurile celei de-a doua expansiuni descrise în prezenta (de exemplu incluzând expansiune cum ar fi cele descrise în etapa D din Figura 27, precum și cele denumite REP) necesită un surplus de celule feeder în timpul expansiunii REP TIL și/sau în a doua expansiune. În multe aplicări, celulele feeder sunt celule mononucleare din sângele periferic (PBMC) obținute din unități de sânge integral standard de la donatori de sânge sănătoși. PBMC se obțin prin metode standard cum ar fi separare în
10 gradient Ficoll-Paque.

În general, PBMC alogenice sunt inactivate, prin iradiere sau tratament termic, și utilizate în procedurile REP, așa cum se descrie în exemple, în special exemplul 14, care asigură un protocol exemplificativ pentru evaluarea incompetenței de replicare a PBMC alogenice iradiate.

15 În unele aplicări, PBMC sunt considerate incompetente pentru replicare și acceptate pentru utilizare în procedurile de expansiune TIL descrise în prezenta dacă numărul total al celulelor viabile în ziua 14 este mai mic decât numărul celulelor viabile inițiale cultivate în ziua 0 a REP și/sau ziua 0 a celei de-a doua expansiuni (*i.e.*, ziua debutului celei de-a doua expansiuni). Vezi, de exemplu, Exemplul 14.

20 În unele aplicări, PBMC sunt considerate incompetente pentru replicare și acceptate pentru utilizare în procedurile de expansiune TIL descrise în prezenta dacă numărul total al celulelor viabile, cultivate în prezența OKT3 și IL-2, în ziua 7 și ziua 14, nu a crescut față de numărul celulelor viabile inițiale cultivate în ziua 0 a REP și/sau ziua 0 a celei de-a doua expansiuni (*i.e.*, ziua debutului celei de-a doua expansiuni). În unele aplicări, PBMC sunt cultivate în prezența a 30 ng/ml anticorp OKT3 și 3000 IU/ml IL-2. Vezi, de exemplu, Exemplul 13.

25 În unele aplicări, PBMC sunt considerate incompetente pentru replicare și acceptate pentru utilizare în procedurile de expansiune TIL descrise în prezenta dacă numărul total al celulelor viabile, cultivate în prezența OKT3 și IL-2, în ziua 7 și ziua 14, nu a crescut față de numărul celulelor viabile inițiale cultivate în ziua 0 a REP și/sau ziua 0 a celei de-a doua expansiuni (*i.e.*, ziua debutului celei de-a doua expansiuni). În unele aplicări, PBMC sunt cultivate în prezența a 5-60 ng/ml anticorp OKT3 și 1000-6000 IU/ml IL-2. În unele aplicări, PBMC sunt cultivate în prezența a 10-50 ng/ml anticorp OKT3 și 2000-5000
30 IU/ml IL-2. În unele aplicări, PBMC sunt cultivate în prezența a 20-40 ng/ml anticorp OKT3 și 2000-4000 IU/ml IL-2. În unele aplicări, PBMC sunt cultivate în prezența a 25-35 ng/ml anticorp OKT3 și 2500-3500 IU/ml IL-2.

În unele aplicări, celulele feeder de prezentare a antigenului sunt PBMC. În unele aplicări, celulele feeder de prezentare a antigenului sunt celule feeder de prezentare a antigenului artificiale. Într-o aplicare, raportul dintre TIL și celulele feeder de prezentare a antigenului în a doua expansiune este circa 1 până la
35 25, circa 1 până la 50, circa 1 până la 100, circa 1 până la 125, circa 1 până la 150, circa 1 până la 175, circa 1 până la 200, circa 1 până la 225, circa 1 până la 250, circa 1 până la 275, circa 1 până la 300, circa 1 până la 325, circa 1 până la 350, circa 1 până la 375, circa 1 până la 400 sau circa 1 până la 500. Într-o aplicare, raportul dintre TIL și celulele feeder de prezentare a antigenului în a doua expansiune este între 1 până la
40 50 și 1 până la 300. Într-o aplicare, raportul dintre TIL și celulele feeder de prezentare a antigenului în a doua expansiune este între 1 până la 100 și 1 până la 200.

Într-o aplicare, procedurile celei de-a doua expansiuni descrise în prezenta necesită un raport de circa 2.5×10^9 celule feeder până la circa 100×10^6 TIL. Într-o altă aplicare, procedurile celei de-a doua expansiuni descrise în prezenta necesită un raport de circa 2.5×10^9 celule feeder până la circa 50×10^6 TIL.
45 Într-o altă aplicare, procedurile celei de-a doua expansiuni descrise în prezenta necesită circa 2.5×10^9 celule feeder până la circa 25×10^6 TIL.

Într-o aplicare, procedurile celei de-a doua expansiuni descrise în prezenta necesită un surplus de celule feeder în a doua expansiune. În multe aplicări, celulele feeder sunt celule mononucleare din sângele periferic (PBMC) obținute din unități de sânge integral standard de la donatori de sânge sănătoși. PBMC
50 se obțin prin metode standard cum ar fi separare în gradient Ficoll-Paque. Într-o aplicare, se folosesc celule de prezentare a antigenului artificiale (aAPC) în locul PBMC.

În general, PBMC alogenice sunt inactivate, prin iradiere sau tratament termic, și folosite în procedurile de expansiune TIL descrise în prezenta, inclusiv procedurile exemplificative descrise în Figurile 4, 5, și 27.

55 Într-o aplicare, celulele de prezentare a antigenului artificiale se folosesc în a doua expansiune ca înlocuitor sau în combinație cu PBMC.

2. Citokine

Metodele de expansiune descrise în prezenta folosesc în general mediu de cultură cu doze mari de citokină, în special IL-2, așa cum se cunoaște în domeniu.

Alternativ, este posibilă utilizarea combinațiilor de citokine pentru expansiunea rapidă și/sau a doua expansiune TIL, cu combinații de două sau mai multe dintre IL-2, IL-15 și IL-21, așa cum se indică în general în documentația internațională nr. WO 2015/189356 și documentația internațională nr. WO 2015/189357. Astfel, combinațiile posibile includ IL-2 și IL-15, IL-2 și IL-21, IL-15 și IL-21 și IL-2, IL-15 și IL-21, aceasta din urmă fiind deosebit de utilă în multe aplicări. Utilizarea combinațiilor de citokine favorizează în mod specific generarea limfocitelor și, în mod specific, celule T descrise în prezenta.

3. Anticorpi anti-CD3

În unele aplicări, mediul de cultură folosit în metodele de expansiune descrise în prezenta (inclusiv cele denumite REP, vezi de exemplu Figura 27) include de asemenea un anticorp anti-CD3. Un anticorp anti-CD3 în combinație cu IL-2 induce activarea celulelor T și diviziunea celulară în populația TIL. Acest efect poate fi observat cu anticorpi în lungime completă, precum și fragmente Fab și F(ab')₂, primul fiind în general preferat; vezi, *de ex.*, Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719.

După cum se va înțelege în domeniu, există mai mulți anticorpi anti-CD3 uman adecvați utilizabili în invenție, inclusiv anticorpi policlonali și monoclonali anti-CD3 uman de la diferite mamifere, inclusiv, dar nelimitativ, anticorpi murini, umani, de primat, șobolan și canini. În aplicări specifice, se utilizează anticorpii anti-CD3 OKT3 (disponibil în comerț de la Ortho-McNeil, Raritan, NJ sau Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

E. ETAPA E: Recoltarea TIL

După etapa celei de-a doua expansiuni, celulele pot fi recoltate. În unele aplicări TIL sunt recoltate după una, două, trei, patru sau mai multe etape de expansiune, de exemplu prevăzute în Figura 27. În unele aplicări TIL sunt recoltate după două etape de expansiune, de exemplu prevăzute în Figura 27.

TIL pot fi recoltate în orice mod corespunzător și steril, inclusiv de exemplu prin centrifugare. Metodele de recoltare TIL sunt bine cunoscute în domeniu și se pot folosi oricare din aceste metode cunoscute în procesul din prezenta. În unele aplicări, TIL sunt recoltate folosind un sistem automat.

Dispozitivele de recoltare celulară și/sau sistemele de procesare celulară sunt disponibile în comerț din o varietate de surse, inclusiv, de exemplu, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer, și Inotech Biosystems International, Inc. Se poate folosi orice dispozitiv de recoltare celulară în metodele din prezenta. În unele aplicări, dispozitivul de recoltare celulară și/sau sistemul de procesare celulară este un dispozitiv de recoltare celulară pe bază de membrană. În unele aplicări, recoltarea celulară se efectuează printr-un sistem de procesare celulară, cum ar fi sistemul LOVO (fabricat de Fresenius Kabi). Termenul "sistem de procesare celulară LOVO" se referă de asemenea la orice instrument sau dispozitiv fabricat de orice furnizor, care poate pompa o soluție conținând celule printr-o membrană sau un filtru, cum ar fi o membrană sau filtru de centrifugare într-un mediu de sistem steril și/sau închis, permițând fluxul continuu și procesarea celulară pentru a îndepărta supernatantul sau mediul de cultură celulară fără peletizare. În unele aplicări, dispozitivul de recoltare celulară și/sau sistemul de procesare celulară poate efectua separarea celulelor, spălare, schimb de fluid, concentrare și/sau alte etape de procesare celulară într-un sistem steril, închis.

În unele aplicări, recoltarea, de exemplu, Etapa E din Figura 27, se efectuează dintr-un bioreactor în sistem închis. În unele aplicări, se utilizează un sistem închis pentru expansiunea TIL, descris în prezenta. În unele aplicări, se utilizează un singur bioreactor. În unele aplicări, bioreactorul unic folosit este de exemplu G-REX -10 sau G-REX -100. În unele aplicări, bioreactorul în sistem închis este un singur bioreactor.

F. ETAPA F: Compoziție finală / transfer în punga de perfuzie

După încheierea Etapelor A - E prevăzute într-o ordine exemplificativă în Figura 27 și specificate detaliat mai sus și în prezenta, celulele se transferă într-un recipient utilizabil pentru administrarea la un pacient. În unele aplicări, după ce se obține un număr terapeutic suficient de TIL folosind metodele de expansiune descrise mai sus, acestea se transferă într-un recipient în vederea administrării la un pacient.

TIL amplificate folosind APC din prezenta invenție pot fi administrate unui pacient ca o compoziție farmaceutică. Într-o aplicare, compoziția farmaceutică este o suspensie de TIL într-un tampon steril. TIL amplificate folosind PBMC din prezenta invenție se pot administra pe orice cale adecvată cunoscută în domeniu. Celulele T pot fi administrate ca o singură perfuzie intra-arterială sau intravenoasă, care durează de preferință aproximativ 30 până la 60 de minute. Alte căi de administrare adecvate includ calea intraperitoneală, intratecală și intralimfatică.

1. Compoziții farmaceutice, doze și regimuri de dozaj

Într-o aplicare, TIL amplificate folosind metodele din prezenta invenție se administrează unui pacient ca o compoziție farmaceutică. Într-o aplicare, compoziția farmaceutică este o suspensie de TIL într-o soluție tampon sterilă. TIL amplificate folosind PBMC din prezenta invenție se pot administra pe orice cale adecvată cunoscută în domeniu. Celulele T pot fi administrate ca o singură perfuzie intra-arterială

sau intravenoasă, care durează de preferință aproximativ 30 până la 60 de minute. Alte căi de administrare adecvate includ calea intraperitoneală, intratecală și intralimfatică.

Se poate administra orice doză adecvată de TIL. Se pot administra de la aproximativ 2.3×10^{10} la aproximativ 13.7×10^{10} TIL, cu o medie de circa 7.8×10^{10} TIL, în special dacă cancerul este melanom. Se pot administra aproximativ 1.2×10^{10} până la aproximativ 4.3×10^{10} de TIL. Se pot administra aproximativ 3×10^{10} până la aproximativ 12×10^{10} TIL. Se pot administra aproximativ 4×10^{10} până la aproximativ 10×10^{10} TIL. Se pot administra aproximativ 5×10^{10} până la aproximativ 8×10^{10} TIL. Se pot administra aproximativ 6×10^{10} până la aproximativ 8×10^{10} TIL. Se pot administra aproximativ 7×10^{10} până la aproximativ 8×10^{10} TIL. În unele aplicări, dozajul terapeutic eficient este circa 2.3×10^{10} până la circa 13.7×10^{10} . În unele aplicări, dozajul terapeutic eficient este circa 7.8×10^{10} TIL, în special când cancerul este melanom. În unele aplicări, dozajul terapeutic eficient este circa 1.2×10^{10} până la circa 4.3×10^{10} TIL. În unele aplicări, dozajul terapeutic eficient este circa 3×10^{10} până la circa 12×10^{10} TIL. În unele aplicări, dozajul terapeutic eficient este circa 4×10^{10} până la circa 10×10^{10} TIL. În unele aplicări, dozajul terapeutic eficient este circa 5×10^{10} până la circa 8×10^{10} TIL. În unele aplicări, dozajul terapeutic eficient este circa 6×10^{10} până la circa 8×10^{10} TIL. În unele aplicări, dozajul terapeutic eficient este circa 7×10^{10} până la circa 8×10^{10} TIL.

În unele aplicări, numărul TIL prevăzut în compozițiile farmaceutice din invenție este circa 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} și 9×10^{13} . Într-o aplicare, numărul TIL prevăzut în compozițiile farmaceutice din invenție este în intervalul de 1×10^6 până la 5×10^6 , 5×10^6 până la 1×10^7 , 1×10^7 până la 5×10^7 , 5×10^7 până la 1×10^8 , 1×10^8 până la 5×10^8 , 5×10^8 până la 1×10^9 , 1×10^9 până la 5×10^9 , 5×10^9 până la 1×10^{10} , 1×10^{10} până la 5×10^{10} , 5×10^{10} până la 1×10^{11} , 5×10^{11} până la 1×10^{12} , 1×10^{12} până la 5×10^{12} , și 5×10^{12} până la 1×10^{13} .

În unele aplicări, concentrația TIL prevăzută în compozițiile farmaceutice din invenție este mai mică decât, de exemplu, 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% sau 0.0001% g/g, g/v sau v/v din compoziția farmaceutică.

În unele aplicări, concentrația TIL prevăzută în compozițiile farmaceutice din invenție este mai mare decât 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% sau 0.0001% g/g, g/v sau v/v din compoziția farmaceutică.

În unele aplicări, concentrația TIL prevăzută în compozițiile farmaceutice din invenție este în intervalul de la circa 0.0001% până la circa 50%, circa 0.001% până la circa 40%, circa 0.01% până la circa 30%, circa 0.02% până la circa 29%, circa 0.03% până la circa 28%, circa 0.04% până la circa 27%, circa 0.05% până la circa 26%, circa 0.06% până la circa 25%, circa 0.07% până la circa 24%, circa 0.08% până la circa 23%, circa 0.09% până la circa 22%, circa 0.1% până la circa 21%, circa 0.2% până la circa 20%, circa 0.3% până la circa 19%, circa 0.4% până la circa 18%, circa 0.5% până la circa 17%, circa 0.6% până la circa 16%, circa 0.7% până la circa 15%, circa 0.8% până la circa 14%, circa 0.9% până la circa 12% sau circa 1% până la circa 10% g/g, g/v sau v/v din compoziția farmaceutică.

În unele aplicări, concentrația TIL prevăzută în compozițiile farmaceutice din invenție este în intervalul de la circa 0.001% până la circa 10%, circa 0.01% până la circa 5%, circa 0.02% până la circa 4.5%, circa 0.03% până la circa 4%, circa 0.04% până la circa 3.5%, circa 0.05% până la circa 3%, circa 0.06% până la circa 2.5%, circa 0.07% până la circa 2%, circa 0.08% până la circa 1.5%, circa 0.09% până la circa 1%, circa 0.1% până la circa 0.9% g/g, g/v sau v/v din compoziția farmaceutică.

În unele aplicări, cantitatea de TIL prevăzută în compozițiile farmaceutice din invenție este egală cu sau mai mică decât 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 sau 0.0001 g.

În unele aplicări, cantitatea de TIL prevăzută în compozițiile farmaceutice din invenție este mai mare decât 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 sau 10 g.

TIL prevăzute în compozițiile farmaceutice din invenție sunt eficiente într-un interval de dozaj larg. Dozajul exact va depinde de calea de administrare, forma în care se administrează compusul, sexul și vârsta subiectului tratat, greutatea corporală a subiectului tratat și preferința și experiența medicului curant. Se pot folosi dozajele stabilite clinic ale TIL dacă se consideră adecvat. Cantitățile compozițiilor farmaceutice administrate folosind metodele din prezenta, cum ar fi dozajele TIL, vor depinde de omul sau mamiferul tratat, gravitatea bolii sau afecțiunii, rata de administrare, ingredientele farmaceutice active și decizia medicului.

În unele aplicări, TIL se pot administra într-o singură doză. Această administrare se poate realiza prin injecție, *de ex.*, injecție intravenoasă. În unele aplicări, TIL se pot administra în doze multiple. Dozajul poate fi o dată, de două ori, de trei ori, de patru ori, de cinci ori, de șase ori sau de mai multe ori pe an. Dozajul poate fi o dată pe lună, o dată la două săptămâni, o dată pe săptămână sau o dată la două zile. Administrarea TIL poate continua atâta timp cât este necesar.

În unele aplicări, un dozaj eficient al TIL este circa 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} și 9×10^{13} . În unele aplicări, un dozaj eficient al TIL este în intervalul de 2×10^{10} până la 5×10^6 , 5×10^6 până la 1×10^7 , 1×10^7 până la 5×10^7 , 5×10^7 până la 1×10^8 , 1×10^8 până la 5×10^8 , 5×10^8 până la 1×10^9 , 1×10^9 până la 5×10^9 , 5×10^9 până la 1×10^{10} , 1×10^{10} până la 5×10^{10} , 5×10^{10} până la 1×10^{11} , 5×10^{11} până la 1×10^{12} , 1×10^{12} până la 5×10^{12} și 5×10^{12} până la 1×10^{13} .

În unele aplicări, un dozaj eficient al TIL este în intervalul de circa 0.01 mg/kg până la circa 4.3 mg/kg, circa 0.15 mg/kg până la circa 3.6 mg/kg, circa 0.3 mg/kg până la circa 3.2 mg/kg, circa 0.35 mg/kg până la circa 2.85 mg/kg, circa 0.15 mg/kg până la circa 2.85 mg/kg, circa 0.3 mg/kg până la circa 2.15 mg/kg, circa 0.45 mg/kg până la circa 1.7 mg/kg, circa 0.15 mg/kg până la circa 1.3 mg/kg, circa 0.3 mg/kg până la circa 1.15 mg/kg, circa 0.45 mg/kg până la circa 1 mg/kg, circa 0.55 mg/kg până la circa 0.85 mg/kg, circa 0.65 mg/kg până la circa 0.8 mg/kg, circa 0.7 mg/kg până la circa 0.75 mg/kg, circa 0.7 mg/kg până la circa 2.15 mg/kg, circa 0.85 mg/kg până la circa 2 mg/kg, circa 1 mg/kg până la circa 1.85 mg/kg, circa 1.15 mg/kg până la circa 1.7 mg/kg, circa 1.3 mg/kg până la circa 1.6 mg/kg, circa 1.35 mg/kg până la circa 1.5 mg/kg, circa 2.15 mg/kg până la circa 3.6 mg/kg, circa 2.3 mg/kg până la circa 3.4 mg/kg, circa 2.4 mg/kg până la circa 3.3 mg/kg, circa 2.6 mg/kg până la circa 3.15 mg/kg, circa 2.7 mg/kg până la circa 3 mg/kg, circa 2.8 mg/kg până la circa 3 mg/kg sau circa 2.85 mg/kg până la circa 2.95 mg/kg.

În unele aplicări, un dozaj eficient al TIL este în intervalul de circa 1 mg până la circa 500 mg, circa 10 mg până la circa 300 mg, circa 20 mg până la circa 250 mg, circa 25 mg până la circa 200 mg, circa 1 mg până la circa 50 mg, circa 5 mg până la circa 45 mg, circa 10 mg până la circa 40 mg, circa 15 mg până la circa 35 mg, circa 20 mg până la circa 30 mg, circa 23 mg până la circa 28 mg, circa 50 mg până la circa 150 mg, circa 60 mg până la circa 140 mg, circa 70 mg până la circa 130 mg, circa 80 mg până la circa 120 mg, circa 90 mg până la circa 110 mg sau circa 95 mg până la circa 105 mg, circa 98 mg până la circa 102 mg, circa 150 mg până la circa 250 mg, circa 160 mg până la circa 240 mg, circa 170 mg până la circa 230 mg, circa 180 mg până la circa 220 mg, circa 190 mg până la circa 210 mg, circa 195 mg până la circa 205 mg sau circa 198 mg până la circa 207 mg.

O cantitate eficientă a TIL se poate administra într-o singură doză sau în doze multiple prin oricare dintre modurile acceptate de administrare a agenților având utilități similare, inclusiv cale intranasală și transdermică, prin injecție intra-arterială, intravenos, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutanat, topic, prin transplant sau prin inhalare.

G. Analize opționale ale viabilității celulare

Opțional, se poate efectua o analiză a viabilității celulare după prima expansiune din Etapa B, folosind teste standard cunoscute în domeniu. De exemplu, un test de excludere cu albastru tripan poate fi

efectuat pe o probă de TIL în masă, care marchează selectiv celulele moarte și permite o evaluare a viabilității. Alte teste utilizabile în testarea viabilității pot include nelimitativ testul cu albastru Alamar; și testul MTT.

1. Număr de celule, viabilitate, citometrie în flux

5 În unele aplicări, se măsoară numărul și/sau viabilitatea celulelor. Expresia markerilor cum ar fi, nelimitativ, CD3, CD4, CD8, și CD56, precum și alții divulgați sau descriși în prezenta, poate fi măsurată prin citometrie în flux cu anticorpi, de exemplu, nelimitativ, cei disponibili în comerț de la BD Bio-sciences (BD Biosciences, San Jose, CA) folosind un citometru în flux FACSCanto™ (BD Biosciences). Celulele pot fi numărate manual folosind un hemocitometru c-chip de unică folosință (VWR, Batavia, IL) și

10 viabilitatea poate fi determinată folosind orice metodă cunoscută în domeniu, inclusiv, dar nelimitativ colorare cu albastru tripan.

În unele cazuri, populația TIL în masă poate fi crioconservată imediat, folosind protocoalele discutate mai jos. Alternativ, populația TIL în masă poate fi supusă REP și apoi crioconservată așa cum se discută mai jos. În mod similar, în cazul în care se vor folosi TIL modificate genetic în terapie, populațiile

15 TIL în masă sau REP pot fi supuse modificărilor genetice pentru tratamente adecvate.

2. Culturi celulare

Într-o aplicare, o metodă de expansiune TIL poate include folosirea a circa 5.000 mL până la circa 25.000 mL de mediu celular, circa 5.000 mL până la circa 10.000 mL de mediu celular sau circa 5.800 mL până la circa 8.700 mL de mediu celular. Într-o aplicare, amplificarea numărului de TIL utilizează nu mai

20 mult de un tip de mediu de cultură celulară. Se poate folosi orice mediu de cultură celulară adecvat, de ex., mediu AIM-V (L-glutamină, 50 μM streptomicină sulfat și 10 μM gentamicină sulfat) (Invitrogen, Carlsbad CA). În această privință, metodele din invenție reduc în mod avantajos cantitatea de mediu și numărul tipurilor de mediu necesare pentru amplificarea numărului de TIL. Într-o aplicare, amplificarea numărului de TIL poate cuprinde adăugarea mediului de cultură celulară proaspăt în celule (denumită și hrănirea celulelor) nu mai frecvent decât o dată la trei sau patru zile. Amplificarea numărului de celule într-un

25 recipient permeabil la gaz simplifică procedurile necesare pentru amplificarea numărului de celule prin reducerea frecvenței de hrănire necesare pentru amplificarea celulelor.

Într-o aplicare, mediul celular din primul și/sau al doilea recipient permeabil la gaz este nefiltrat. Folosirea mediului celular nefiltrat poate simplifica procedurile necesare pentru a amplifica numărul

30 celulelor. Într-o aplicare, mediul celular din primul și/sau al doilea recipient permeabil la gaz este lipsit de beta-mercaptopetanol (BME).

Într-o aplicare, durata metodei cuprinzând obținerea unei probe tisulare tumorale de la mamifer; cultivarea probei tisulare tumorale într-un prim recipient permeabil la gaz conținând mediul celular; obținerea TIL din proba tisulară tumorală; amplificarea numărului TIL într-un al doilea recipient permeabil

35 la gaz conținând mediul celular folosind aAPC pe o durată de circa 14 până la circa 42 zile, *de ex.*, circa 28 zile.

Într-o aplicare, TIL sunt amplificate în vase permeabile la gaz. Vasele permeabile la gaz se folosesc pentru amplificarea TIL folosind PBMC prin intermediul metodelor, compozițiilor și dispozitivelor cunoscute în domeniu, inclusiv cele descrise în documentația cererii de brevet U.S. nr. 2005/0106717 A1.

40 Într-o aplicare, TIL sunt amplificate în recipiente permeabile la gaz. Într-o aplicare, TIL sunt amplificate folosind un sistem de expansiune celulară care amplifică TIL în recipiente permeabile la gaz, cum ar fi Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). Într-o aplicare, TIL sunt amplificate folosind un sistem de expansiune celulară care amplifică TIL în recipiente permeabile la gaz, cum ar fi WAVE Bioreactor System, cunoscut și ca Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). Într-o aplicare, sistemul de expansiune

45 celulară include un recipient celular permeabil la gaz cu un volum selectat din grupul constând din circa 100 mL, circa 200 mL, circa 300 mL, circa 400 mL, circa 500 mL, circa 600 mL, circa 700 mL, circa 800 mL, circa 900 mL, circa 1 L, circa 2 L, circa 3 L, circa 4 L, circa 5 L, circa 6 L, circa 7 L, circa 8 L, circa 9 L și circa 10 L. Într-o aplicare, TIL pot fi amplificate în baloane G-Rex (disponibile în comerț de la Wilson Wolf Manufacturing). Aceste aplicări permit amplificarea populațiilor celulare de la circa 5×10^5 celule/cm² la între 10×10^6 și 30×10^6 celule/cm². Într-o aplicare, această expansiune se efectuează fără adăugarea mediului de cultură celulară proaspăt în celule (denumită și hrănirea celulelor). Într-o aplicare, aceasta se efectuează fără hrănire atâta vreme cât mediul persistă la o înălțime de circa 10 cm în balonul G-Rex. Într-o aplicare, aceasta se efectuează fără hrănire, dar cu adăugarea uneia sau mai multor citokine. Într-o aplicare, citokinele pot fi adăugate în bolus fără necesitatea amestecării citokinelor cu mediul. Aceste

50 recipiente, dispozitive și metode se cunosc în domeniu, se utilizează pentru amplificarea TIL și le includ pe cele descrise în documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2014/0377739A1, documentația internațională nr. WO 2014/210036 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. us 2013/0115617 A1, documentația internațională nr. WO 2013/188427 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2011/0136228 A1, brevetul U.S. nr. US 8,809,050 B2, documentația internațională nr. WO 2011/072088 A2, documentația

cererii de brevet U.S. nr. US 2016/0208216 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2012/0244133 A1, documentația internațională nr. WO 2012/129201 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2013/0102075 A1, brevetul U.S. nr. US 8,956,860 B2, documentația internațională nr. WO 2013/173835 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2015/0175966 A1. Aceste procese sunt de asemenea

5 descrise în Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292.

Modificarea genetică opțională a TIL

În unele aplicări, TIL sunt opțional modificate genetic pentru a include alte funcționalități, inclusiv, dar nelimitativ, un receptor T celular de mare afinitate (TCR), *de ex.*, un TCR direcționat la un antigen asociat cu tumoare cum ar fi MAGE-1, HER2 sau NY-ESO-1, sau un receptor antigenic himeric

10 (CAR) care se leagă de o moleculă de suprafața celulară asociată cu tumoare (*de ex.*, mezotelina) sau o moleculă de suprafața celulară restricționată de origine (*de ex.*, CD19).

H. Crioconservare opțională TIL

Așa cum se discută mai sus și se exemplifică în Etapele A - E prevăzute în Figura 27, crioconservarea poate avea loc în numeroase puncte în cadrul procesului de expansiune TIL. În unele aplicări, populația TIL amplificată după a doua expansiune (prevăzută de exemplu conform etapei D din

15 Figura 27) poate fi crioconservată. Crioconservarea se poate realiza în general prin așezarea populației TIL într-o soluție de congelare, *de ex.*, 85% ser AB inactivat cu complement și 15% dimetil sulfoxid (DMSO). Celulele din soluție se introduc în fiole criogenice și se depozitează 24 de ore la -80°C, cu transfer opțional în congelatoare cu azot gazos pentru crioconservare. Vezi Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-

20 986. În unele aplicări, TIL sunt crioconservate în 5% DMSO. În unele aplicări, TIL sunt crioconservate în mediul de cultură celulară plus 5% DMSO. În unele aplicări, TIL sunt crioconservate conform metodelor prevăzute în Exemplele 8 și 9.

Când este cazul, celulele se îndepărtează din congelator și sunt decongelate într-o baie de apă la 37°C până când se dezgheață aproximativ 4/5 din soluție. Celulele sunt în general resuspendate în mediu

25 complet și opțional spălate o dată sau de mai multe ori. În unele aplicări, TIL decongelate pot fi numărate și testate cu privire la viabilitate, așa cum se cunoaște în domeniu.

I. Caracteristici fenotipice ale TIL amplificate

În unele aplicări, TIL se analizează cu privire la expresia numeroaselor markerilor fenotipici după expansiune, inclusiv cei descriși în prezenta și în exemple. Într-o aplicare, se examinează expresia unuia

30 sau mai multor markeri fenotipici. În unele aplicări, caracteristicile fenotipice ale TIL se analizează după prima expansiune în etapa B. În unele aplicări, caracteristicile fenotipice ale TIL se analizează în timpul tranziției în etapa C. În unele aplicări, caracteristicile fenotipice ale TIL se analizează în timpul tranziției din etapa C și după crioconservare. În unele aplicări, caracteristicile fenotipice ale TIL se analizează după

35 a doua expansiune conform etapei D. În unele aplicări, caracteristicile fenotipice ale TIL se analizează după două sau mai multe expansiuni conform etapei D. În unele aplicări, markerul este selectat din grupul constând din TCRab (*i.e.*, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 și HLA-DR. În unele aplicări, markerul este selectat din grupul constând din TCRab (*i.e.*, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56 și CD8a. Într-o aplicare, markerul este selectat din grupul

40 constând din CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 și HLA-DR. În unele aplicări, se examinează expresia unuia, a doi, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, unsprezece, doisprezece, treisprezece sau paisprezece markeri. În unele aplicări, se examinează expresia unuia sau mai multor markeri din fiecare grup. În unele aplicări, una sau mai multe dintre expresia HLA-DR, CD38 și CD69 se mențin (*i.e.*, nu prezintă o diferență statistic semnificativă) în TIL proaspete față de TIL decongelate. În unele aplicări, starea de activare TIL se menține în TIL.

Într-o aplicare, se măsoară expresia unuia sau mai multor markeri regulatori. În unele aplicări, markerul regulator este selectat din grupul constând din CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 și CD154. În unele aplicări, markerul regulator este selectat din grupul constând din CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1 și TIM-3. În unele aplicări, markerul regulator este selectat din grupul constând din CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 și CD154. În unele aplicări, expresia moleculelor reguloare este scăzută în TIL decongelate față de TIL proaspete. În unele aplicări, expresia moleculelor reguloare LAG-3 și TIM-3 este scăzută în TIL decongelate față de TIL proaspete. În unele aplicări, nu există diferență semnificativă în expresia CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$. În unele aplicări, nu există diferență semnificativă în expresia CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ și/sau a markerilor de memorie în TIL proaspete față de TIL decongelate. În unele aplicări, nu există diferență semnificativă în expresia CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ între TIL produse prin metodele prevăzute în prezenta, exemplificate în Figura 27, și/sau

55 TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27.

În unele aplicări, nu se realizează selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL, a populației TIL recoltate și/sau a populației TIL terapeutice pe

baza expresiei CD4, CD8 și/sau NK, TCR $\alpha\beta$ în nici o etapă, inclusiv cele discutate mai sus sau prevăzute de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, nu se realizează selecție a primei populații de TIL pe baza CD4, CD8 și/sau NK, TCR $\alpha\beta$. În unele aplicări, nu se realizează selecție a celei de-a doua populații de TIL pe baza expresiei CD4, CD8 și/sau NK, TCR $\alpha\beta$. În unele aplicări, nu se realizează selecție a populației recoltate de TIL pe baza expresiei CD4, CD8 și/sau NK, TCR $\alpha\beta$. În unele aplicări, nu se realizează selecție a populației terapeutice de TIL pe baza expresiei CD4, CD8 și/sau NK, TCR $\alpha\beta$.

Într-un exemplu, nu se realizează selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL sau a populației TIL recoltate pe baza expresiei CD4, CD8 și/sau NK, TCR $\alpha\beta$ în nici una dintre etapele (a) - (f) ale metodei de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) într-o populație terapeutică de TIL cuprinzând:

(a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un pacient prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

(b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

(c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului.

Într-un exemplu, nu se realizează selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL sau a populației TIL recoltate pe baza expresiei CD4, CD8 și/sau NK, TCR $\alpha\beta$ în nici una dintre etapele (a) - (h) ale metodei de tratare a unui subiect cu cancer, metoda cuprinzând administrarea limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) amplificate cuprinzând:

(a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

(b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

(c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului;

(g) opțional crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (f) folosind un proces de crioconservare; și

(h) administrarea unui dozaj terapeutic eficient din a treia populație de TIL din pungă de perfuzie în etapa (g) la pacient.

În unele aplicări, markerul de memorie este selectat din grupul constând din CCR7 și CD62L

În unele aplicări, viabilitatea TIL proaspete față de TIL decongelate este cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95% sau cel puțin 98%. În unele aplicări, viabilitatea a TIL atât proaspete, cât și decongelate este mai mare de 70%, mai mare de 75%, mai mare de 80%, mai mare de 85%, mai mare de 90%, mai mare de 95% sau mai mare de 98%. În unele aplicări, viabilitatea produsului atât proaspăt, cât și decongelat este mai mare de 80%, mai mare de 81%, mai mare de 82%, mai mare de 83%, mai mare de 84%, mai mare de 85%, mai mare de 86%, mai mare de 87%, mai mare de 88%, mai mare de 89% sau mai mare de 90%. În unele aplicări, viabilitatea produsului atât proaspăt, cât și decongelat este mai mare de 86%.

Într-o aplicare, TIL restimulate pot fi evaluate de asemenea cu privire la eliberarea citokinelor, folosind teste de eliberare a citokinelor. În unele aplicări, TIL pot fi evaluate cu privire la secreția interferon-7 (IFN-7) în răspuns la stimulare cu OKT3 sau co-cultură cu digestie tumorală autologă. De exemplu, în aplicările care utilizează stimulare OKT3, TIL sunt bine spălate și se prepară godeuri în duplicat cu 1×10^5 celule în 0.2 mL CM în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat, preacoperite cu 0.1 sau 1.0 $\mu\text{g/mL}$ OKT3 diluat în ser fiziologic tamponat cu fosfat. După incubare peste noapte, supernatanții sunt recoltați și IFN-7 din supernatant se măsoară prin ELISA (Pierce/Endogen, Woburn, MA). Pentru testul de co-cultură, se introduc 1×10^5 celule TIL într-o placă cu 96 de godeuri cu celule tumorale autologe (raport 1:1). După incubare 24 de ore, supernatanții sunt recoltați și eliberarea IFN-7 poate fi cuantificată, de exemplu prin ELISA.

Analiza citometrică în flux a biomarkerilor de suprafață celulară: probele TIL au fost împărțite în părți alicote pentru analiza citometrică în flux a markerilor de suprafață celulară, de exemplu vezi Exemplele 7, 8 și 9.

În unele aplicări, TIL sunt evaluate cu privire la diferiți markeri regulatori. În unele aplicări, markerul regulator este selectat din grupul constând din TCR α/β , CD56, CD27, CD28, CD57, CD45RA, CD45RO, CD25, CD127, CD95, IL-2R-, CCR7, CD62L, KLRG1 și CD122. În unele aplicări, markerul regulator este TCR α/β . În unele aplicări, markerul regulator este CD56. În unele aplicări, markerul regulator este CD27. În unele aplicări, markerul regulator este CD28. În unele aplicări, markerul regulator este CD57. În unele aplicări, markerul regulator este CD45RA. În unele aplicări, markerul regulator este CD45RO. În unele aplicări, markerul regulator este CD25. În unele aplicări, markerul regulator este CD127. În unele aplicări, markerul regulator este CD95. În unele aplicări, markerul regulator este IL-2R-. În unele aplicări, markerul regulator este CCR7. În unele aplicări, markerul regulator este CD62L. În unele aplicări, markerul regulator este KLRG1. În unele aplicări, markerul regulator este CD122.

Într-o aplicare, TIL amplificate sunt analizate cu privire la expresia diferiților markeri fenotipici, inclusiv cei descriși în prezenta și în exemple. Într-o aplicare, se examinează expresia unuia sau mai multor markeri fenotipici. În unele aplicări, markerul este selectat din grupul constând din TCRab (*i.e.*, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 și HLA-DR. În unele aplicări, markerul este selectat din grupul constând din TCRab (*i.e.*, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56 și CD8a. Într-o aplicare, markerul este selectat din grupul constând din CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 și HLA-DR. În unele aplicări, se examinează expresia unuia, a doi, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, unsprezece, doisprezece, treisprezece sau paisprezece markeri. În unele aplicări, se examinează expresia unuia sau mai multor markeri din fiecare grup. În unele aplicări, expresia unuia sau mai multora dintre HLA-DR, CD38 și CD69 se menține (*i.e.*, nu prezintă diferență statistic semnificativă) în TIL proaspete față de TIL decongelate. În unele aplicări, starea de activare a TIL se menține în TIL decongelate.

Într-o aplicare, se măsoară expresia unuia sau mai multor markeri regulatori. În unele aplicări, markerul regulator este selectat din grupul constând din CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 și CD154. În unele aplicări, markerul regulator este selectat din grupul constând din CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1 și TIM-3. În unele aplicări, markerul regulator este selectat din grupul constând din CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 și CD154. În unele aplicări, expresia moleculelor reguloare este scăzută în TIL decongelate față de TIL proaspete. În unele aplicări, expresia moleculelor reguloare LAG-3 și TIM-3 este scăzută în TIL decongelate față de TIL proaspete. În unele aplicări, nu există diferență semnificativă în expresia CD4, CD8, NK, TCR α/β . În unele aplicări, nu există diferență semnificativă în expresia CD4, CD8, NK, TCR α/β și/sau a markerilor de memorie în TIL proaspete față de TIL decongelate.

În unele aplicări markerul de memorie este selectat din grupul constând din CCR7 și CD62L.

În unele aplicări, viabilitatea TIL proaspete față de TIL decongelate este cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95% sau cel puțin 98%. În unele aplicări, viabilitatea a TIL atât proaspete, cât și decongelate este mai mare de 70%, mai mare de 75%, mai mare de 80%, mai mare de 85%, mai mare de 90%, mai mare de 95% sau mai mare de 98%. În unele aplicări, viabilitatea produsului atât proaspăt, cât și decongelat este mai mare de 80%, mai mare de 81%, mai mare

de 82%, mai mare de 83%, mai mare de 84%, mai mare de 85%, mai mare de 86%, mai mare de 87%, mai mare de 88%, mai mare de 89% sau mai mare de 90%. În unele aplicări, viabilitatea produsului atât proaspăt, cât și decongelat este mai mare de 86%.

5 Într-o aplicare, TIL restimulate pot fi evaluate de asemenea cu privire la eliberarea citokinelor, folosind teste de eliberare a citokinelor. În unele aplicări, TIL pot fi evaluate cu privire la secreția interferon-7 (IFN-7) în răspuns la stimulare cu OKT3 sau co-cultură cu digestie tumorală autologă. De exemplu, în aplicări care utilizează stimulare OKT3, TIL sunt bine spălate și se prepară godeuri în duplicat cu 1×10^5 celule în 0.2 mL CM în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat, preacoperite cu 0.1 sau 1.0 $\mu\text{g/mL}$ OKT3 diluat în ser fiziologic tamponat cu fosfat. După incubare peste noapte, supernatanții sunt recoltați și IFN-7 din supernatant se măsoară prin ELISA (Pierce/Endogen, Woburn, MA). Pentru testul de co-cultură, 1×10^5 celule TIL sunt așezate într-o placă cu 96 de godeuri cu celule tumorale autologe (raport 1:1). După o incubare de 24 de ore, supernatanții sunt recoltați și eliberarea IFN-7 poate fi cuantificată, de exemplu prin ELISA.

În unele aplicări, caracterizarea fenotipică se examinează după crioconservare.

15 **J. Sănătatea metabolică a TIL amplificate**

TIL restimulate se caracterizează prin creșterea semnificativă a glicolizei bazale față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL post-decongelate. Într-o aplicare, nu se realizează selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL, a populației TIL recoltate și/sau a populației TIL terapeutice pe baza expresiei CD8 în nici o etapă, inclusiv cele discutate mai sus sau prevăzute de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, nu se realizează selecție a primei populații de TIL pe baza expresiei CD8. În unele aplicări, nu se realizează selecție a celei de-a doua populații de TIL pe baza expresiei CD8. În unele aplicări, nu se realizează selecție a celei de-a treia populații de TIL pe baza expresiei CD8. În unele aplicări, nu se realizează selecție a populației recoltate de TIL pe baza expresiei CD8. În unele aplicări, nu se realizează selecție a populației terapeutice de TIL pe baza expresiei CD8.

25 Într-un exemplu, nu se realizează selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL sau a populației TIL recoltate pe baza expresiei CD8 în nici una dintre etapele (a) - (f) ale metodei de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) într-o populație terapeutică de TIL cuprinzând:

30 (a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un pacient prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

(b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

35 (c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

40 (d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

45 (e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului.

50 Într-un exemplu, nu se realizează selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL sau a populației TIL recoltate pe baza expresiei CD8 în nici una dintre etapele (a) - (h) ale metodei de tratare a unui subiect cu cancer, metoda cuprinzând administrarea limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) amplificate cuprinzând:

(a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

55 (b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

(c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL

are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului;

(g) opțional crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (f) folosind un proces de crioconservare; și

(h) administrarea unui dozaj terapeutic eficient din a treia populație de TIL din punga de perfuzie în etapa (g) la pacient.

TIL preparate prin metodele descrise în prezenta se caracterizează prin creșterea semnificativă a glicolizei bazale în comparație, de exemplu, cu TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. Într-o aplicare, nu se realizează selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL, a populației TIL recoltate și/sau a populației TIL terapeutice pe baza expresiei CD8 în nici o etapă, inclusiv cele discutate mai sus sau prevăzute de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, nu se realizează selecție a primei populații de TIL pe baza expresiei CD8. În unele aplicări, nu se realizează selecție a celei de-a doua populații de TIL pe baza expresiei CD8. În unele aplicări, nu se realizează selecție a celei de-a treia populații de TIL pe baza expresiei CD8. În unele aplicări, nu se realizează selecție a populației recoltate de TIL pe baza expresiei CD8. În unele aplicări, nu se realizează selecție a populației terapeutice de TIL pe baza expresiei CD8. Într-o aplicare, nu se realizează selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL sau a populației TIL recoltate pe baza expresiei CD8 în nici una dintre etapele (a) - (h).

Capacitatea respiratorie de rezervă (SRC) și rezerva glicolitică pot fi evaluate pentru TIL amplificate cu diferite metode din prezenta invenție. Testul Seahorse XF Cell Mito Stress Test măsoară funcția mitocondrială prin măsurarea directă a ratei de consum al oxigenului (OCR) a celulelor, folosind modulatori ai respirației care țintesc componente ale lanțului de transport al electronilor în mitocondrii. Compușii de testare (oligomicina, FCCP și un amestec de rotenonă și antimicina A, așa cum se descrie mai jos) se injectează în serie pentru a măsura producția ATP, respirația maximă și respirația non-mitocondrială. Se calculează apoi scurgerea protonilor și capacitatea respiratorie de rezervă folosind acești parametri și respirația bazală. Fiecare modulator țintește o componentă specifică a lanțului de transport al electronilor. Oligomicina inhibă ATP sintaza (complexul V) și scăderea OCR după injecția cu oligomicină se corelează cu respirația mitocondrială asociată cu producția ATP celulară. Carbonil cianura-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) este un agent de decuplare care distruge gradientul protonilor și potențialul membranar mitocondrial. Prin urmare, fluxul electronilor prin lanțul de transport al electronilor este neînhibat și oxigenul este consumat maxim de complexul IV. OCR stimulată de FCCP se poate folosi apoi pentru a calcula capacitatea respiratorie de rezervă, definită ca diferența între respirația maximă și respirația bazală. Capacitatea respiratorie de rezervă (SRC) măsoară capacitatea celulei de a răspunde la necesar energetic mărit. A treia injecție este un amestec de rotenonă, un inhibitor de complex I și antimicina A, un inhibitor de complex III. Această combinație oprește respirația mitocondrială și permite calculul respirației non-mitocondriale activate de procese în afara mitocondriilor. În unele aplicări, compararea se face, de exemplu, cu TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27.

În unele aplicări, testul metabolic este respirația bazală. În general, TIL din a doua expansiune au o rată a respirației bazale de cel puțin 50%, cel puțin 55%, cel puțin 60%, cel puțin 65%, cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rata respirației bazale este de la circa 50% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rata respirației bazale este de la circa 60% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate

folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rata respirației bazale este de la circa 70% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rata respirației bazale este de la circa 80% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rata respirației bazale este de la circa 90% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rata respirației bazale este de la circa 95% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o rată a respirației bazale care nu este diferită semnificativ statistic de rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, compararea se face, de exemplu, cu TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27.

În unele aplicări, testul metabolic este capacitatea respiratorie de rezervă. În general, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o capacitate respiratorie de rezervă de cel puțin 50%, cel puțin 55%, cel puțin 60%, cel puțin 65%, cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, capacitatea respiratorie de rezervă este de la circa 50% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate. În unele aplicări, capacitatea respiratorie de rezervă este de la circa 50% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, capacitatea respiratorie de rezervă este de la circa 60% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, capacitatea respiratorie de rezervă este de la circa 70% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, capacitatea respiratorie de rezervă este de la circa 80% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate. În unele aplicări, capacitatea respiratorie de rezervă este de la circa 90% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, capacitatea respiratorie de rezervă este de la circa 95% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o capacitate respiratorie de rezervă care nu este diferită semnificativ statistic de rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27.

În general, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o capacitate respiratorie de rezervă de cel puțin 50%, cel puțin 55%, cel puțin 60%, cel puțin 65%, cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, testul metabolic măsurat este rezerva glicolitică. În unele aplicări, testul metabolic este capacitatea respiratorie de rezervă. Pentru a măsura metabolismul (respirator) celular, celulele au fost tratate cu inhibitori ai respirației mitocondriale și glicolizei pentru a determina un profil metabolic pentru TIL constând din următoarele măsurători: fosforilarea oxidativă de referință (măsurată prin OCR), capacitatea respiratorie de rezervă, activitatea glicolitică de referință (măsurată prin ECAR) și rezerva glicolitică. Profilurile metabolice s-au realizat folosind testul de stres mitocondrial/glicolitic combinat Seahorse

(inclusiv kitul disponibil în comerț de la Agilent®), care permite determinarea capacității celulelor de a efectua glicoliza la blocarea producției ATP mitocondriale. În unele aplicări, celulele sunt lipsite de glucoză, apoi se injectează glucoză, urmată de un agent de stres. În unele aplicări, agentul de stres este selectat din grupul constând din oligomicina, FCCP, rotenona, antimicina A și/sau 2-deoxiglucoză (2-DG), precum și combinații ale acestora. În unele aplicări, oligomicina se adaugă la 10 mM. În unele aplicări, FCCP se adaugă la 10 mM. În unele aplicări, rotenona se adaugă la 2.5 mM. În unele aplicări, antimicina A se adaugă la 2.5 mM. În unele aplicări, 2-deoxiglucoza (2-DG) se adaugă la 500 mM. În unele aplicări, se măsoară capacitatea glicolică, rezerva glicolică și/sau acidificarea neglicolică. În general, TIL au o rezervă glicolică de cel puțin 50%, cel puțin 55%, cel puțin 60%, cel puțin 65%, cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolică este de la circa 50% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolică este de la circa 60% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolică este de la circa 70% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolică este de la circa 80% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolică este de la circa 90% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolică este de la circa 95% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27.

În unele aplicări, testul metabolic este glicoliza de bază. În unele aplicări, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o creștere a glicolizei de bază de cel puțin două ori, cel puțin trei ori, cel puțin patru ori, cel puțin cinci ori, cel puțin șase ori, cel puțin 7 ori, cel puțin opt ori, cel puțin nouă ori sau cel puțin zece ori față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o creștere a glicolizei de bază de circa două ori până la circa de zece ori față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o creștere a glicolizei de bază de circa două ori până la circa de zece ori față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o creștere a glicolizei de bază de circa trei ori până la circa șapte ori față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o creștere a glicolizei de bază de circa două ori până la circa patru ori față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o creștere a glicolizei de bază de circa două ori până la circa trei ori față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27.

În general, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au o rezervă glicolică de cel puțin 50%, cel puțin 55%, cel puțin 60%, cel puțin 65%, cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% din rata

respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolitică este de la circa 50% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate. În unele aplicări, rezerva glicolitică este de la circa 60% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolitică este de la circa 70% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolitică este de la circa 80% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolitică este de la circa 90% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, rezerva glicolitică este de la circa 95% până la circa 99% din rata respirației bazale a TIL proaspăt recoltate.

Producerea granzimei B: Granzima B este o altă măsură a capacității TIL de a distruge celule țintă. Supernatanții din mediu restimulați așa cum se descrie mai sus folosind anticorpi la CD3, CD28 și CD137/4-1BB s-au evaluat de asemenea cu privire la nivelurile Granzimei B folosind kitul Human Granzyme B DuoSet ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN) conform instrucțiunilor producătorului. În unele aplicări, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au producție mărită a Granzimei B. În unele aplicări, TIL din a doua expansiune sau TIL din a doua expansiune suplimentară (cum ar fi, de exemplu, cele descrise în etapa D din Figura 27, inclusiv TIL denumite TIL reREP) au activitate citotoxică mărită.

În unele aplicări, se poate folosi lungimea telomerilor pentru a măsura viabilitatea celulelor și/sau funcția celulară. În unele aplicări, telomerii au în mod surprinzător aceeași lungime în TIL produse prin prezenta invenție față de TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. Măsurarea lungimii telomerilor: se folosesc diverse metode pentru măsurarea lungimii telomerilor în ADN genomic și preparate citologice. Analiza fragmentelor de restricție telomerică (TRF) este etalonul de aur al măsurării lungimii telomerilor (de Lange et al., 1990). Totuși, limitarea majoră a TRF este necesitatea unei cantități mari de ADN (1.5 μ g). În prezenta invenție pot fi folosite două tehnici larg utilizate pentru măsurarea lungimii telomerilor, și anume hibridizarea fluorescență in situ (FISH; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) și PCR cantitativă. În unele aplicări, Nu există nici o modificare a lungimii telomerilor între TIL din recoltarea inițială în etapa A și TIL amplificate de exemplu din Etapa D prevăzută în Figura 27.

În unele aplicări, sănătatea TIL se măsoară prin secreția IFN-gamma (IFN- γ). În unele aplicări, secreția IFN- γ indică TIL active. În unele aplicări, se utilizează un test de potențial pentru producerea IFN- γ . Producția IFN- γ este o altă măsură a potențialului citotoxic. Producția IFN- γ poate fi măsurată prin determinarea nivelurilor de citokine IFN- γ în mediul TIL stimulate cu anticorpi la CD3, CD28 și CD137/4-1BB. Nivelurile IFN γ în mediul din aceste TIL stimulate pot fi determinate măsurând eliberarea IFN- γ . În unele aplicări, o creștere a producției IFN- γ de exemplu în TIL din Etapa D prevăzută în Figura 27 față de TIL recoltate inițial de exemplu în Etapa A prevăzută în Figura 27 indică o creștere a potențialului citotoxic a TIL din Etapa D. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită o dată, de două ori, trei ori, patru ori sau cinci ori sau de mai multe ori. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită o dată. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de două ori. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de trei ori. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de patru ori. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de cinci ori. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară folosind un kit Quantikine ELISA. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară în TIL *ex vivo*. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară în TIL *ex vivo*, inclusiv TIL produse prin metodele din prezenta invenție, inclusiv de exemplu metodele din Figura 27, precum și TIL proaspăt recoltate sau TIL produse prin alte metode, cum ar fi cele prezăzute de exemplu în Figura 83 (cum ar fi de exemplu TIL din procesul 1C).

În unele aplicări, potențialul citotoxic al TIL de a liza celule țintă s-a evaluat folosind un test de co-cultură a TIL cu linia celulară bioluminescentă, P815 (clona G6), conform unui test de liză redirecționată bioluminescentă (test de potențial) pentru testul TIL care măsoară citotoxicitatea TIL într-o manieră dependentă de doză foarte sensibilă.

În unele aplicări, metodele din prezenta prevăd un test de evaluare a viabilității TIL folosind metodele descrise mai sus. În unele aplicări, TIL sunt amplificate așa cum se discută mai sus, including de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, TIL sunt crioconservate înaintea evaluării viabilității. În unele aplicări, evaluarea viabilității include decongelarea TIL înainte de efectuarea unei prime expansiuni, a unei

a doua expansiuni și a unei a doua expansiuni suplimentare. În unele aplicări, metodele din prezenta prevăd un test de evaluare a proliferării, toxicității, morții celulare și/sau alți termeni referitori la viabilitatea populației TIL. Viabilitatea se poate măsura prin oricare dintre testele metabolice TIL descrise mai sus, precum și orice metode cunoscute pentru evaluarea viabilității celulelor. În unele aplicări, metodele din prezenta prevăd un test de evaluare a proliferării, toxicității, morții celulare și/sau alți termeni referitori la viabilitatea TIL amplificate folosind metodele descrise în prezenta, inclusiv cele exemplificate în Figura 27.

Prezenta invenție oferă, de asemenea, metode de testare pentru determinarea viabilității TIL. În unele aplicări, TIL au viabilitate egală față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, TIL au viabilitate crescută față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. Prezenta invenție prevede metode de evaluare TIL cu privire la viabilitate prin amplificarea limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) într-o populație mai mare de TIL cuprinzând:

(i) obținerea unei prime populații de TIL care a fost amplificată anterior;

(ii) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL; și

(iii) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este cel puțin de 100 de ori mai mare în număr decât a doua populație de TIL și unde a doua expansiune se efectuează cel puțin 14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL cuprinde o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL și unde a treia populație este de asemenea testată cu privire la viabilitate.

Metoda mai poate cuprinde:

(iv) efectuarea unei a doua expansiuni suplimentare prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a treia populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 suplimentar și APC suplimentare, unde a doua expansiune suplimentară se efectuează cel puțin 14 zile pentru a obține o populație mai mare de TIL decât cea obținută în etapa (iii), unde populația de TIL mai mare cuprinde o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a treia populație de TIL și unde a treia populație este de asemenea testată cu privire la viabilitate.

Înainte etapei (i), celulele pot fi crioconservate.

Celulele pot fi decongelate înainte de efectuarea etapei (i).

Etapa (iv) poate fi repetată o dată până la de patru ori pentru a obține TIL suficiente pentru analiză.

Etapele (i) până la (iii) sau (iv) se pot efectua într-o perioadă de circa 40 zile până la circa 50 zile.

Etapele (i) până la (iii) sau (iv) se pot efectua într-o perioadă de circa 42 zile până la circa 48 zile.

Etapele (i) până la (iii) sau (iv) se pot efectua într-o perioadă de circa 42 zile până la circa 45 zile.

Etapele (i) până la (iii) sau (iv) se pot efectua în circa 44 zile.

Celulele din etapele (iii) sau (iv) pot exprima CD4, CD8 și TCR α β la niveluri similare cu celule proaspăt recoltate.

Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule mononucleare din sângele periferic (PBMC).

PBMC pot fi adăugate în cultura celulară în oricare dintre zilele 9 - 17 în etapa (iii).

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală din populația mai mare de TIL în etapa (iv) pot prezenta una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27, expresie CD28, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută, față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală din a treia populație de celule.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută.

APC pot fi APC artificial (aAPC).

Metoda mai poate cuprinde etapa de transducție a primei populații de TIL cu un vector de expresie cuprinzând un acid nucleic care codifică un receptor T celular de mare afinitate.

Etapa de transducție poate avea loc înainte de etapa (i).

Metoda mai poate cuprinde etapa de transducție a primei populații de TIL cu un vector de expresie cuprinzând un acid nucleic care codifică un receptor antigenic himeric (CAR) cuprinzând un anticorp al fragmentului variabil monocatenar fuzionat cu cel puțin un endodomeniu al unei molecule de semnalizare a celulelor T.

Etapa de transducție poate avea loc înaintea etapei (i).

TIL pot fi analizate cu privire la viabilitate.

TIL pot fi analizate cu privire la viabilitate după crioconservare.

TIL pot fi analizate cu privire la viabilitate după crioconservare și după etapa (iv).

Diversii receptori antigenici ai limfocitelor T și B se produc prin recombinarea somatică a unui număr limitat, dar mare, de segmente genice. Aceste segmente genice: V (variabil), D (diversitate), J (juxtapunere) și C (constant) determină specificitatea legării și aplicările în aval ale imunoglobulinelor și receptorilor T celulari (TCR). Prezenta invenție prevede o metodă de generare a TIL care prezintă și cresc diversitatea repertoriului celulelor T (denumită uneori policlonalitate). În unele aplicări, creșterea diversității repertoriului celulelor T este față de TIL proaspăt recoltate și/sau TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, TIL obținute prin metoda din prezenta prezintă o creștere a diversității repertoriului celulelor T. În unele aplicări, TIL obținute în prima expansiune prezintă o creștere a diversității repertoriului celulelor T. În unele aplicări, creșterea diversității este o creștere a diversității imunoglobulinelor și/sau a diversității receptorilor T celulari. În unele aplicări, diversitatea imunoglobulinică este în lanțul greu al imunoglobulinei. În unele aplicări, diversitatea imunoglobulinică este în lanțul ușor al imunoglobulinei. În unele aplicări, diversitatea este în receptorul T celular. În unele aplicări, diversitatea este în unul dintre receptorii T celulari selectați din grupul constând din receptori alpha, beta, gamma și delta. În unele aplicări, există o creștere a expresiei receptorului T celular (TCR) alpha și/sau beta. În unele aplicări, există o creștere a expresiei receptorului T celular (TCR) alpha. În unele aplicări, există o creștere a expresiei receptorului T celular (TCR) beta. În unele aplicări, există o creștere a expresiei TCRab (*i.e.*, TCR α/β).

Conform prezentei invenții, se prevede o metodă de testare TIL cu privire la viabilitate și/sau utilizarea ulterioară în administrare la un subiect. Metoda de analiză a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) poate cuprinde:

- (i) obținerea unei prime populații de TIL;
- (ii) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL; și
- (iii) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât a doua populație de TIL;
- (iv) recoltarea, spălarea și crioconservarea celei de-a treia populații de TIL;
- (v) depozitarea TIL crioconservate la o temperatură criogenică;
- (vi) decongelarea celei de-a treia populații de TIL pentru a furniza o a treia populație de TIL decongelate; și
- (vii) efectuarea unei a doua expansiuni suplimentare a unei porțiuni din a treia populație de TIL decongelate prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a treia populații cu IL-2, OKT-3 și APC pe o perioadă de expansiune suplimentară (denumită uneori perioadă reREP) de cel puțin 3 zile, unde a treia expansiune se efectuează pentru a obține o a patra populație de TIL, unde numărul TIL din a patra populație de TIL este comparat cu numărul TIL din a treia populație de TIL pentru a obține un raport;
- (viii) determinarea pe baza raportului din etapa (vii) dacă populația de TIL decongelate este adecvată pentru administrare unui pacient;
- (ix) administrarea unui dozaj terapeutic eficient din a treia populație de TIL decongelate la pacient când raportul dintre numărul TIL din a patra populație de TIL și numărul TIL din a treia populație de TIL este determinat ca fiind mai mare de 5:1 în etapa (viii).

Perioada de expansiune suplimentară (denumită uneori perioadă reREP) se poate efectua până când raportul dintre numărul TIL din a patra populație de TIL și numărul TIL din a treia populație de TIL este mai mare de 50:1.

Numărul de TIL suficient pentru un dozaj terapeutic eficient poate fi de la circa 2.3×10^{10} până la circa 13.7×10^{10} .

Etapele (i) până la (vii) se pot efectua într-o perioadă de circa 40 zile până la circa 50 zile. Etapele (i) până la (vii) se pot efectua într-o perioadă de circa 42 zile până la circa 48 zile. Etapele (i) până la (vii) se pot efectua într-o perioadă de circa 42 zile până la circa 45 zile. Etapele (i) până la (vii) se pot efectua în circa 44 zile.

Celulele din etapele (iii) sau (vii) pot exprima CD4, CD8 și TCR $\alpha \beta$ la niveluri similare cu celulele proaspăt recoltate. Celulele pot fi TIL.

Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule mononucleare din sângele periferic (PBMC). PBMC pot fi adăugate în cultura celulară în oricare dintre zilele 9 - 17 în etapa (iii).

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală în populația mai mare de TIL din etapele (iii) sau (vii) pot prezenta una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27, expresie CD28, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută, față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală din a treia populație de celule.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută.

APC pot fi APC artificiale (aAPC).

5 Etapa de transducție a primei populații de TIL cu un vector de expresie poate cuprinde un acid nucleic care codifică un receptor T celular de mare afinitate.

Etapa de transducție poate avea loc înaintea etapei (i).

Etapa de transducție a primei populații de TIL cu un vector de expresie poate cuprinde un acid nucleic care codifică un receptor antigenic himeric (CAR) cuprinzând un anticorp al fragmentului variabil monocatenar fuzionat cu cel puțin un endodomeniu al unei molecule de semnalizare a celulelor T.

10 Etapa de transducție poate avea loc înaintea etapei (i).

TIL pot fi analizate cu privire la viabilitate după etapa (vii).

Prezenta invenție prevede de asemenea metode de evaluare a TIL. Invenția prevede o metodă de evaluare a TIL cuprinzând:

15 (i) obținerea unei porțiuni dintr-o primă populație de TIL crioconservate;

(ii) decongelarea porțiunii primei populații de TIL crioconservate;

(iii) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea porțiunii primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC) pe o perioadă de expansiune suplimentară (denumită uneori perioadă reREP) de cel puțin 3 zile, pentru a produce o a doua populație de TIL, unde porțiunea din prima populație de TIL este comparată cu a doua populație de TIL pentru a obține un raport al numărului TIL, unde raportul numărului de TIL în a doua populație de TIL la numărul de TIL din porțiunea primei populații de TIL este mai mare de 5:1;

(iv) determinarea pe baza raportului din etapa (iii) dacă prima populație de TIL este adecvată pentru utilizare în administrarea terapeutică la un pacient;

25 (v) determinarea că prima populație de TIL este adecvată pentru utilizare în administrare terapeutică atunci când raportul numărului TIL din a doua populație de TIL la numărul TIL din prima populație de TIL este mai mare de 5:1 în etapa (iv).

Raportul numărului TIL din a doua populație de TIL și numărul TIL din porțiunea primei populații de TIL poate fi mai mare de 50:1.

30 Metoda mai poate cuprinde efectuarea expansiunii întregii primei populații de TIL crioconservate de la etapa (i) conform metodelor descrise în oricare dintre aplicările prevăzute în prezenta.

Metoda mai poate cuprinde administrarea întregii primei populații de TIL crioconservate de la etapa (i) la pacient.

K. Sisteme închise pentru prepararea TIL

35 Prezenta invenție prevede utilizarea sistemelor închise în timpul procesului de cultivare TIL. Aceste sisteme închise permit prevenirea și/sau reducerea contaminării microbiene, permit utilizarea unor baloane mai puține și permit scăderi ale costurilor. În unele aplicări, sistemul închis utilizează două recipiente.

40 Aceste sisteme închise sunt bine cunoscute în domeniu și pot fi găsite, de exemplu, la <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> și <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>.

Așa cum se prevede pe website-ul FDA, sistemele închise cu metode sterile sunt cunoscute și descrise. Vezi <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>, menționate mai sus și prevăzute în partea pertinentă de mai jos.

Introducere

45 Dispozitivele de conectare sterilă (STCD) produc suduri sterile între două bucăți de tuburi compatibile. Această procedură permite conectarea sterilă a unei varietăți de recipiente și diametre ale tuburilor. Aceste îndrumări descriu practicile recomandate și procedurile utilizate pentru aceste dispozitive. Aceste îndrumări nu abordează datele sau informațiile pe care un producător de dispozitive de conectare sterilă trebuie să le depună la FDA pentru a obține aprobare sau autorizație pentru comercializare. Este de

50 asemenea important de menționat că utilizarea unui dispozitiv de conectare sterilă aprobat în scopuri care nu sunt autorizate pe etichetă pot cauza considerarea dispozitivului ca fiind contrafăcut și falsificat în conformitate cu Legea federală privind alimentele, drogurile și produsele cosmetice.

1. Recomandări FDA

55 Producătorii produșilor sanguini care propun utilizarea curentă a STCD aprobate de FDA ar trebui să includă informații privind această utilizare în manualele de procedură operațională standard (SOP) pentru fiecare produs sanguin. Aceste informații ar trebui să includă evidențe, urmărirea produsului, controlul calității sudurii, numerele de lot pentru software și consumabile (inclusiv surse ale elementelor de adăugat). Procedurile de control al calității ar trebui să includă un test al integrității fiecărei suduri.

2. Aplicații ale STCD

Utilizatorul ar trebui să știe că utilizarea dispozitivului poate crea un produs nou sau poate modifica semnificativ configurația unui produs reglementat pentru care siguranța și eficiența nu au fost demonstrate. Pentru aceste "produse noi" care fac obiectul licenței, cererile sau anexele cererilor trebuie depuse la FDA pe lângă depunerea unei SOP. În general, gruparea sau amestecarea ce implică unele componente celulare reprezintă o modificare a produsului care necesită depunerea și aprobarea unei cereri sau a unei anexe a cererii de licență. Aceste cereri și anexe ar trebui să cuprindă date și descrieri ale procedurilor de fabricare care demonstrează că "produsul nou" este sigur și eficient pentru utilizarea prevăzută în perioada propusă.

Următoarele comentarii sunt prezentate ca o îndrumare privind cele mai frecvente utilizări ale unui STCD aprobat sau autorizat de FDA:

L. Adăugarea unui ac nou sau mai mic într-un set de prelevare sânge

Utilizarea STCD pentru adăugarea unui ac înainte de inițierea unei proceduri (recoltare de sânge integral, afereza trombocitară sau colectarea plasmei sursă) nu se consideră deschidere a unui sistem funcțional închis. Dacă se adaugă un ac în timpul unei proceduri, ar trebui utilizat numai un STCD aprobat pentru sudarea tuburilor umplute cu lichid. Dacă testul integrității sudurii este satisfăcător, folosirea unui STCD nu se consideră deschidere a unui sistem funcțional închis.

Trombocitele de afereză preparate într-un sistem deschis ar trebui marcate cu o dată de expirare de 24 de ore și produșii trombocite de afereză preparați într-un sistem funcțional închis ar trebui marcați cu o dată de expirare de cinci zile (vezi Revised Guideline for Collection of Platelets, Pheresis, October 7, 1988).

Sursa și specificațiile tuburilor și acelor adăugate ar trebui indicate în SOP și evidențele centrului de sânge. Utilizarea STCD pentru adăugarea acelor nu reprezintă o modificare majoră de fabricare pentru care instituțiile licențiate necesită preaprobare.

M. Utilizarea STCD pentru prepararea componentelor

Când STCD se utilizează pentru atașarea altor recipiente de preparare a componentelor, trebuie să se păstreze evidențe corespunzătoare care să identifice sursa pachetelor de transfer și verificarea adecvată a numărului unităților de sânge și ABO/Rh. Sângele și componentele sanguine trebuie etichetate în mod adecvat (21 CFR 606.121).

Exemple:

- Adăugarea unui al patrulea recipient într-un pachet triplu de recoltare a sângelui integral pentru producerea AHF crioprecipitat din plasmă proaspătă congelată.
- Conectarea unei soluții aditive într-o unitate de hematii.
- Adăugarea unui filtru aprobat de FDA pentru utilizare în fabricarea componentelor.
- Adăugarea unui al treilea recipient de depozitare într-un echipament de afereză trombocitară.
- Pentru utilizările indicate mai sus, trebuie să se elaboreze proceduri și să se țină evidențe, însă licențele nu necesită aprobare FDA pentru instituirea procedurilor.

1. Utilizarea STCD pentru colectarea produșilor sanguini

Utilizarea corespunzătoare a unui STCD pentru colectarea trombocitelor preparate din prelevare de sânge integral poate preveni contaminarea posibilă de la ac și admisiile folosite de obicei. Colectarea efectuată imediat înaintea transfuziei este un exemplu de o astfel de utilizare corespunzătoare. Trombocitele colectate ar trebui administrate la nu mai mult de 4 ore după colectare (vezi 21 CFR 606.122(1)(2)).

Totuși, colectarea și depozitarea ulterioară pot crește riscul comparativ cu administrarea unităților donatorilor aleatorii; dacă o unitate contaminată este colectată cu altele și depozitată înainte de administrare, inoculul bacterian total administrat poate fi mărit ca urmare a replicării în vilum suplimentar. Astfel, utilizarea propusă a unui STCD pentru colectarea și depozitarea trombocitelor mai mult de 4 ore ar trebui susținută de date care să arate în mod satisfăcător dacă o astfel de colectare este asociată cu risc crescut.

Această colectare a trombocitelor constituie fabricare de produs nou.

Colectarea sau amestecarea care include trombocite se consideră fabricare a unui produs nou care necesită depunerea și aprobarea unei cereri sau anexe de autorizare dacă perioada de depozitare depășește paru ore.

2. Utilizarea STCD pentru prepararea unei părți alicote pentru uz pediatric și unități separate

Unitățile pediatrice și unitățile separate pentru sânge integral, hematii și plasmă proaspătă congelată preparate folosind un STCD nu se vor considera produs nou pentru care este necesară o suplimentare a cererii de licență biologică (BLA) dacă sunt îndeplinite următoarele condiții:

Producătorul trebuie să dețină o licență sau un supliment de licență biologică aprobată pentru produsul original (i.e., neseparat), inclusiv aprobare pentru fiecare anticoagulant folosit.

Etichetele trebuie trimise pentru analiză și aprobare înainte de distribuție. Trebuie inclusă o notă în conformitate cu secțiunea FDA Form 2567, Transmiterea etichetelor și prospectelor.

Trebuie folosite recipientele de produs final aprobate pentru depozitarea componentelor preparate.

5 Trombocitele fabricate sub licență trebuie să conțină cel puțin $5.5 \times (10)^{10}$ trombocite (21 CFR 640.24 (c)). Trombocitele de afereză fabricate sub licență trebuie să conțină cel puțin $3.0 \times (10)^{11}$ trombocite (vezi Revised Guideline for the Collection of Platelets, Pheresis, October 7, 1988).

10 Procedurile urmate privind utilizarea unui STCD pentru prepararea produsilor separați din recoltări de sânge integral și din plasmă și trombocite preparate prin proceduri de hemaferază automată ar trebui să includă următoarele descrieri:

- modul în care echipamentul de afereză sau recipientul de colectare vor fi modificate cu un STCD aprobat de FDA;

- volumul minim al produsilor de plasmă separată sau sânge integral;

- volumul și concentrația trombocitelor din produșii de afereză separați;

15 • perioada de depozitare a produsului. Produsul trebuie conținut într-un recipient aprobat în conformitate cu perioada de depozitare de pe eticheta recipientului respectiv;

- metoda(e) utilizată(e) pentru etichetarea și urmărirea produsilor separați în evidențele centrului de sânge.

20 OBS.: Procedurile de etichetare a părților alicote trebuie indicate clar în evidențele procedurilor pentru a permite urmărirea și rechemarea componentelor, dacă este necesar.

3. Utilizarea unui STCD pentru a conecta alte linii de ser fiziologic sau anticoagulant în timpul unei proceduri de plasmaferază automată

Procedurile trebuie elaborate și evidențele păstrate în conformitate cu instrucțiunile de utilizare ale producătorului instrumentului, dar beneficiarii unei licențe nu necesită aprobare FDA pentru instituirea

25 procedurilor.

4. Utilizarea STCD pentru atașarea soluțiilor de procesare

La utilizarea unui STCD pentru atașarea recipientelor cu soluții de procesare la hematii spălate sau congelate, perioada de expirare a produsilor rezultați este de 24 de ore, cu excepția situației în care datele sunt prevăzute sub forma cererilor sau anexelor de cerere de licență la CBER pentru a susține o perioadă

30 de valabilitate mai îndelungată (21 CFR 610.53(c)). Excepțiile sau modificările trebuie aprobate în formă scrisă de Director, CBER (21 CFR 610.53(d)).

5. Utilizarea unui STCD pentru adăugarea unui filtru de reducere a leucocitelor aprobat de FDA

35 Unele filtre de reducere a leucocitelor nu sunt atașate ca parte integrantă în sistemele de recoltare a sângelui integral. Procedurile de utilizare a unui STCD pentru filtrarea înainte de depozitarea trebuie să fie conforme cu instrucțiunile de utilizare ale producătorului filtrului.

Reducerea leucocitelor înainte de ieșire reprezintă o modificare productivă majoră. Prin urmare, pentru produși noi cu leucocite reduse preparați folosind un STCD, producătorii trebuie să depună cereri de licență biologică (21 CFR 601.2) sau anexe de cerere pre-aprobare la FDA (21 CFR 601.12).

40 Folosirea unui STCD pentru extragerea probelor din recipiente de produși sanguini pentru testare (de ex., folosind un STCD pentru a obține o probă de trombocite dintr-un recipient de trombocite sau trombocite de afereză pentru teste de compatibilitate).

Dacă volumul și/sau numărul de celule ale produsului după prelevarea probei diferă de cele specificate pe eticheta originală sau în prospect, eticheta de pe produs trebuie modificată pentru a reflecta volumul și/sau numărul de celule noi. De exemplu, nu trebuie extrase probe care reduc numărul de trombocite al unei unități de trombocite la mai puțin de $5.5 \times (10)^{10}$ trombocite (21 CFR 640.24 (c)).

6. Alte informații din îndrumările FDA

50 Îndrumările FDA prezintă îndrumări generale, precum și informații și exemple specifice privind specificațiile de depunere a cererilor și anexelor la FDA în legătură cu utilizarea unui STCD. Dacă apar alte întrebări legate de utilizarea adecvată a unui STCD, acestea trebuie adresate la Office of Blood Research and Review, Center for Biologics Evaluation and Research.

În unele aplicații, sistemul închis folosește un recipient din momentul în care se obțin fragmentele tumorale până când TIL sunt gata de administrare la pacient sau de erioconservare. În unele aplicații, când se folosesc două recipiente, primul recipient este un recipient G închis și populația de TIL este centrifugată și transferată într-o pungă de perfuzie fără a deschide primul recipient G închis. În unele aplicații, când se folosesc două recipiente, punga de perfuzie este o pungă de perfuzie conținând HypoThermosol. Un sistem închis sau un sistem de cultură celulară TIL închis se caracterizează prin aceea că, după ce s-au adăugat proba tumorală și/sau fragmentele tumorale, sistemul este închis ermetic de la exterior pentru a forma un mediu închis fără pătrunderea bacteriilor, ciupercilor și/sau orice altă contaminare microbiană.

În unele aplicări, reducerea contaminării microbiene este între circa 5% și circa 100%. În unele aplicări, reducerea contaminării microbiene este între circa 5% și circa 95%. În unele aplicări, reducerea contaminării microbiene este între circa 5% și circa 90%. În unele aplicări, reducerea contaminării microbiene este între circa 10% și circa 90%. În unele aplicări, reducerea contaminării microbiene este între
5 circa 15% și circa 85%. În unele aplicări, reducerea contaminării microbiene este circa 5%, circa 10%, circa 15%, circa 20%, circa 25%, circa 30%, circa 35%, circa 40%, circa 45%, circa 50%, circa 55%, circa 60%, circa 65%, circa 70%, circa 75%, circa 80%, circa 85%, circa 90%, circa 95%, circa 97%, circa 98%, circa 99% sau circa 100%.

Sistemul închis permite creșterea TIL în absența și/sau cu o reducere semnificativă a contaminării
10 microbiene.

În plus, pH-ul, presiunea parțială a dioxidului de carbon și presiunea parțială a oxigenului ale mediului de cultură celulară TIL variază la cultivarea celulelor. În consecință, chiar dacă circulă un mediu adecvat pentru cultura celulară, mediul închis necesită încă menținere constantă ca un mediu optim pentru
15 înmulțirea TIL. În acest scop, este dezirabil ca factorii fizici de pH, presiunea parțială a dioxidului de carbon și presiunea parțială a oxigenului în lichidul de cultură al mediului închis să fie monitorizați cu ajutorul unui senzor, al cărui semnal se utilizează pentru a controla un schimbător de gaz montat la admisia în mediul de cultură și ca presiunea parțială a gazului din mediul închis să fie ajustată în timp real în funcție de
20 modificările din lichidul de cultură pentru a optimiza mediul de cultură celulară. În unele aplicări, prezenta invenție prevede un sistem de cultură celulară închis care include la admisia în mediul închis un schimbător de gaz prevăzut cu un dispozitiv de monitorizare care măsoară pH-ul, presiunea parțială a dioxidului de carbon și presiunea parțială a oxigenului din mediul închis și optimizează mediul de cultură celulară prin
ajustarea automată a concentrațiilor de gaz pe baza semnalelor de la dispozitivul de monitorizare.

În unele aplicări, presiunea din mediul închis este controlată continuu sau intermitent. Aceasta înseamnă că presiunea din mediul închis poate fi variată cu ajutorul unui dispozitiv de menținere a presiunii
25 de exemplu, asigurând că spațiul este adecvat pentru creșterea TIL într-o stare de suprapresiune sau susținând exsudația fluidului într-o stare de subpresiune și favorizând astfel înmulțirea celulelor. În plus, aplicând subpresiune intermitent, este posibilă înlocuirea uniformă și eficientă a lichidului care circulă în mediul închis printr-o reducere temporară a volumului mediului închis.

În unele aplicări, componentele de cultură optime pentru înmulțirea TIL pot fi înlocuite sau
30 adăugate și se pot adăuga inclusiv factori cum ar fi IL-2 și/sau OKT3, precum și combinații.

C. Culturi celulare

Într-o aplicare, o metodă de expansiune TIL, inclusiv cele discutate mai sus și exemplificate în
Figura 27, poate include folosirea a circa 5.000 mL până la circa 25.000 mL de mediu celular, circa 5.000
35 mL până la circa 10.000 mL de mediu celular sau circa 5.800 mL până la circa 8.700 mL de mediu celular. În unele aplicări, mediul este mediu fără ser, descris de exemplu în Exemplul 21. În unele aplicări, mediul din prima expansiune este lipsit de ser. În unele aplicări, mediul din a doua expansiune este lipsit de ser. În unele aplicări, mediile din prima și a doua expansiune sunt ambele lipsite de ser. Într-o aplicare, amplificarea numărului TIL utilizează nu mai mult de un tip de mediu de cultură celulară. Se poate folosi orice mediu de cultură celulară adecvat, *de ex.*, mediu celular AIM-V (L-glutamină, 50 μ M streptomycină
40 sulfat și 10 μ M gentamicină sulfat) (Invitrogen, Carlsbad CA). În această privință, metodele din invenție reduc în mod avantajos cantitatea de mediu și numărul tipurilor de mediu necesare pentru amplificarea numărului de TIL. Într-o aplicare, amplificarea numărului de TIL poate cuprinde hrănirea celulelor nu mai frecvent decât o dată la trei sau patru zile. Amplificarea numărului de celule într-un recipient permeabil la gaz simplifică procedurile necesare pentru amplificarea numărului de celule prin reducerea frecvenței de
45 hrănire necesare pentru amplificarea celulelor.

Într-o aplicare, mediul celular din primul și/sau al doilea recipient permeabil la gaz este nefiltrat. Folosirea mediului celular nefiltrat poate simplifica procedurile necesare pentru a amplifica numărul
50 celulelor. Într-o aplicare, mediul celular din primul și/sau al doilea recipient permeabil la gaz este lipsit de beta-mercaptoetanol (BME).

Durata metodei cuprinzând obținerea unei probe tisulare tumorale de la mamifer; cultivarea probei
55 tisulare tumorale într-un prim recipient permeabil la gaz conținând mediul celular; obținerea TIL din proba tisulară tumorală; amplificarea numărului TIL într-un al doilea recipient permeabil la gaz conținând mediul celular poate fi o durată de circa 7 până la 14 zile, *de ex.*, circa 11 zile. Pre-REP poate fi aproximativ 7 până la 14 zile. În unele aplicări, pre-REP este aproximativ 11 zile. REP poate fi aproximativ 7 până la 14 zile. În unele aplicări, REP este aproximativ 11 zile.

Într-o aplicare, TIL sunt amplificate în vase permeabile la gaz. Vasele permeabile la gaz se folosesc pentru amplificarea TIL folosind PBMC prin intermediul metodelor, compozițiilor și dispozitivelor
cunoscute în domeniu, inclusiv cele descrise în documentația cererii de brevet U.S. nr. 2005/0106717 A1. Într-o aplicare, TIL sunt amplificate în recipiente permeabile la gaz. Într-o aplicare, TIL sunt amplificate

folosind un sistem de expansiune celulară care amplifică TIL în recipiente permeabile la gaz, cum ar fi Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). Într-o aplicare, TIL sunt amplificate folosind un sistem de expansiune celulară care amplifică TIL în recipiente permeabile la gaz, cum ar fi WAVE Bioreactor System, cunoscut și ca Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). Într-o aplicare, sistemul de expansiune celulară include un recipient celular permeabil la gaz cu un volum selectat din grupul constând din circa 100 mL, circa 200 mL, circa 300 mL, circa 400 mL, circa 500 mL, circa 600 mL, circa 700 mL, circa 800 mL, circa 900 mL, circa 1 L, circa 2 L, circa 3 L, circa 4 L, circa 5 L, circa 6 L, circa 7 L, circa 8 L, circa 9 L și circa 10 L.

Într-o aplicare, TIL pot fi amplificate în baloane G-Rex (disponibile în comerț de la Wilson Wolf Manufacturing). Aceste aplicări permit amplificarea populațiilor celulare de la circa 5×10^5 celule/cm² până la între 10×10^6 și 30×10^6 celule/cm². Într-o aplicare, aceasta are loc fără hrănire. Într-o aplicare, aceasta are loc fără hrănire atâta vreme cât mediul persistă la o înălțime de circa 10 cm în balonul G-Rex. Într-o aplicare, aceasta are loc fără hrănire, dar adăugând una sau mai multe citokine. Într-o aplicare, citokinele pot fi adăugate în bolus fără a fi necesară amestecarea citokinelor cu mediul. Aceste recipiente, dispozitive și metode se cunosc în domeniu, se utilizează pentru amplificarea TIL și le includ pe cele descrise în documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2014/0377739A1, documentația internațională nr. WO 2014/210036 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. us 2013/0115617 A1, documentația internațională nr. WO 2013/188427 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2011/0136228 A1, brevetul U.S. nr. US 8,809,050 B2, documentația internațională nr. WO 2011/072088 A2, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2016/0208216 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2012/0244133 A1, documentația internațională nr. WO 2012/129201 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2013/0102075 A1, brevetul U.S. nr. US 8,956,860 B2, documentația internațională nr. WO 2013/173835 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2015/0175966 A1. Aceste procese sunt descrise de asemenea în Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292.

D. Modificarea genetică opțională a TIL

În unele aplicări, TIL sunt opțional modificate genetic pentru a include alte funcționalități, inclusiv, dar nelimitativ, un receptor T celular de mare afinitate (TCR), *de ex.*, un TCR direcționat la un antigen asociat cu tumoare cum ar fi MAGE-1, HER2 sau NY-ESO-1, sau un receptor antigenic himeric (CAR) care se leagă de o moleculă de suprafața celulară asociată cu tumoare (*de ex.*, mezotelina) sau o moleculă de suprafața celulară restricționată de origine (*de ex.*, CD19).

E. Crioconservarea opțională a TIL

Populația TIL în masă sau populația TIL amplificată pot fi opțional crioconservate. În unele aplicări, crioconservarea are loc în populația terapeutică TIL. Crioconservarea are loc în TIL recoltate după a doua expansiune. În unele aplicări, crioconservarea are loc în TIL din Etapa F exemplificativă din Figura 27. În unele aplicări, TIL sunt crioconservate în punga de perfuzie. În unele aplicări, TIL sunt crioconservate înainte de introducerea într-o pungă de perfuzie. În unele aplicări, TIL sunt crioconservate și nu se introduc într-o pungă de perfuzie. În unele aplicări, crioconservarea se efectuează folosind un mediu de crioconservare. În unele aplicări, mediul de crioconservare conține dimetilsulfoxid (DMSO). Aceasta se realizează în general prin introducerea populației TIL într-o soluție de congelare, de ex. 85% ser AB inactivat cu complement și 15% dimetil sulfoxid (DMSO). Celulele din soluție se introduc în fiole criogenice și se depozitează 24 de ore la -80°C, cu transfer opțional în congelatoare cu azot gazos pentru crioconservare. Vezi Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986.

Când este cazul, celulele se îndepărtează din congelator și sunt decongelate într-o baie de apă la 37°C până când se dezgheață aproximativ 4/5 din soluție. Celulele sunt în general resuspendate în mediu complet și opțional spălate o dată sau de mai multe ori. În unele aplicări, TIL decongelate pot fi numărate și testate cu privire la viabilitate, așa cum se cunoaște în domeniu.

Într-o aplicare preferată, o populație TIL este crioconservată folosind mediul de crioconservare CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). Într-o aplicare preferată, o populație TIL este crioconservată folosind un mediu de crioconservare conținând dimetilsulfoxid (DMSO). Într-o aplicare preferată, o populație TIL este crioconservată folosind un raport 1:1 (vol:vol) de CS10 la mediul de cultură celulară. Într-o aplicare preferată, o populație TIL este crioconservată folosind un raport de circa 1:1 (vol:vol) al CS10 la mediul de cultură celulară, cuprinzând și IL-2 suplimentară.

Așa cum se discută mai sus în Etapele A - E, crioconservarea poate avea loc în numeroase puncte în cadrul procesului de expansiune TIL. În unele aplicări, populația TIL în masă după prima expansiune conform etapei B sau populația TIL amplificată după una sau mai multe din a doua expansiune conform etapei D pot fi crioconservate. Crioconservarea se poate realiza în general prin introducerea populației TIL într-o soluție de congelare, *de ex.* 85% ser AB inactivat cu complement și 15% dimetil sulfoxid (DMSO). Celulele din soluție se introduc în fiole criogenice și se depozitează 24 de ore la -80°C, cu transfer opțional

în congelatoare cu azot gazos pentru crioconservare. Vezi Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986.

Când este cazul, celulele se îndepărtează din congelator și sunt decongelate într-o baie de apă la 37°C până când se dezgheață aproximativ 4/5 din soluție. Celulele sunt în general resuspendate în mediu complet și opțional spălate o dată sau de mai multe ori. În unele aplicări, TIL decongelate pot fi numărate și testate cu privire la viabilitate, așa cum se cunoaște în domeniu.

În unele cazuri, populația TIL din Etapa B poate fi crioconservată imediat, folosind protocoalele discutate mai jos. Alternativ, populația TIL în masă poate fi supusă Etapei C și Etapei D și apoi crioconservată după Etapa D. În mod similar, în cazul în care se vor folosi TIL modificate genetic în terapie, populațiile TIL din Etapa B sau Etapa D pot fi supuse modificărilor genetice pentru tratamente adecvate.

F. Analize opționale ale viabilității celulelor

Opțional, se poate efectua un test de viabilitate a celulelor după prima expansiune (denumită uneori expansiune inițială în masă), folosind teste standard cunoscute în domeniu. De exemplu, se poate efectua un test de excludere cu albastru tripan pe o probă de TIL în masă, care marchează selectiv celulele moarte și permite o evaluare a viabilității. Alte teste pentru utilizare în testarea viabilității pot include nelimitativ testul cu albastru Alamar; și testul MTT.

1. Numărul celulelor, viabilitate, citometrie în flux

În unele aplicări, se măsoară numărul și/sau viabilitatea celulelor. Expresia markerilor cum ar fi, nelimitativ, CD3, CD4, CD8, și CD56, precum și alții divulgați sau descriși în prezenta, poate fi măsurată prin citometrie în flux cu anticorpi, de exemplu, nelimitativ, cei disponibili în comerț de la BD Bio-sciences (BD Biosciences, San Jose, CA) folosind un citometru în flux FACSCanto™ (BD Biosciences). Celulele pot fi numărate manual folosind un hemocitometru c-chip de unică folosință (VWR, Batavia, IL) și viabilitatea poate fi determinată folosind orice metodă cunoscută în domeniu, inclusiv, dar nelimitativ colorare cu albastru tripan.

În unele cazuri, populația TIL în masă poate fi crioconservată imediat, folosind protocoalele discutate mai jos. Alternativ, populația TIL în masă poate fi supusă REP și apoi crioconservată așa cum se discută mai jos. În mod similar, în cazul în care se vor folosi TIL modificate genetic în terapie, populațiile TIL în masă sau REP pot fi supuse modificărilor genetice pentru tratamente adecvate.

2. Culturi celulare

Într-o aplicare, o metodă de expansiune TIL poate include folosirea a circa 5.000 mL până la circa 25.000 mL de mediu celular, circa 5.000 mL până la circa 10.000 mL de mediu celular sau circa 5.800 mL până la circa 8.700 mL de mediu celular. Într-o aplicare, amplificarea numărului TIL utilizează nu mai mult de un tip de mediu de cultură celulară. Se poate folosi orice mediu de cultură celulară adecvat, *de ex.*, mediu celular AIM-V (L-glutamină, 50 μM streptomycină sulfat și 10 μM gentamicină sulfat) (Invitrogen, Carlsbad CA). În această privință, metodele din invenție reduc în mod avantajos cantitatea de mediu și numărul tipurilor de mediu necesare pentru amplificarea numărului de TIL. Într-o aplicare, amplificarea numărului de TIL poate cuprinde hrănirea celulelor nu mai frecvent decât o dată la trei sau patru zile. Amplificarea numărului de celule într-un recipient permeabil la gaz simplifică procedurile necesare pentru amplificarea numărului de celule prin reducerea frecvenței de hrănire necesare pentru amplificarea celulelor.

Într-o aplicare, mediul celular din primul și/sau al doilea recipient permeabil la gaz este nefiltrat. Folosirea mediului celular nefiltrat poate simplifica procedurile necesare pentru a amplifica numărul celulelor. Într-o aplicare, mediul celular din primul și/sau al doilea recipient permeabil la gaz este lispit de beta-mercaptoetanol (BME).

Durata metodei cuprinzând obținerea unei probe tisulare tumorale de la mamifer; cultivarea probei tisulare tumorale într-un prim recipient permeabil la gaz conținând mediul celular; obținerea TIL din proba tisulară tumorală; amplificarea numărului TIL într-un al doilea recipient permeabil la gaz conținând mediul celular folosind aAPCs poate avea o durată de circa 14 până la circa 42 zile, *de ex.*, circa 28 zile.

Într-o aplicare, TIL sunt amplificate în vase permeabile la gaz. Vasele permeabile la gaz se folosesc pentru amplificarea TIL folosind PBMC prin intermediul metodelor, compozițiilor și dispozitivelor cunoscute în domeniu, inclusiv cele descrise în documentația cererii de brevet U.S. nr. 2005/0106717 A1. Într-o aplicare, TIL sunt amplificate în recipiente permeabile la gaz. Într-o aplicare, TIL sunt amplificate folosind un sistem de expansiune celulară care amplifică TIL în recipiente permeabile la gaz, cum ar fi Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). Într-o aplicare, TIL sunt amplificate folosind un sistem de expansiune celulară care amplifică TIL în recipiente permeabile la gaz, cum ar fi WAVE Bioreactor System, cunoscut și ca Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). Într-o aplicare, sistemul de expansiune celulară include un recipient celular permeabil la gaz cu un volum selectat din grupul constând din circa 100 mL, circa 200 mL, circa 300 mL, circa 400 mL, circa 500 mL, circa 600 mL, circa 700 mL, circa 800

mL, circa 900 mL, circa 1 L, circa 2 L, circa 3 L, circa 4 L, circa 5 L, circa 6 L, circa 7 L, circa 8 L, circa 9 L și circa 10 L.

Într-o aplicare, TIL pot fi amplificate în baloane G-Rex (disponibile în comerț de la Wilson Wolf Manufacturing). Aceste aplicări permit amplificarea populațiilor celulare de la circa 5×10^5 celule/cm² până la între 10×10^6 și 30×10^6 celule/cm². Într-o aplicare, aceasta are loc fără hrănire. Într-o aplicare, aceasta are loc fără hrănire atâta vreme cât mediul persistă la o înălțime de circa 10 cm în balonul G-Rex. Într-o aplicare, aceasta are loc fără hrănire, dar adăugând una sau mai multe citokine. Într-o aplicare, citokinele pot fi adăugate în bolus fără a fi necesară amestecarea citokinelor cu mediul. Aceste recipiente, dispozitive și metode se cunosc în domeniu, se utilizează pentru amplificarea TIL și le includ pe cele descrise în documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2014/0377739A1, documentația internațională nr. WO 2014/210036 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. us 2013/0115617 A1, documentația internațională nr. WO 2013/188427 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2011/0136228 A1, brevetul U.S. nr. US 8,809,050 B2, documentația internațională nr. WO 2011/072088 A2, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2016/0208216 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2012/0244133 A1, documentația internațională nr. WO 2012/129201 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2013/0102075 A1, brevetul U.S. nr. US 8,956,860 B2, documentația internațională nr. WO 2013/173835 A1, documentația cererii de brevet U.S. nr. US 2015/0175966 A1. Aceste procese sunt descrise de asemenea în Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292.

Modificarea genetică opțională a TIL

În unele aplicări, TIL sunt opțional modificate genetic pentru a include alte funcționalități, inclusiv, dar nelimitativ, un receptor T celular de mare afinitate (TCR), *de ex.*, un TCR direcționat la un antigen asociat cu tumoare cum ar fi MAGE-1, HER2 sau NY-ESO-1, sau un receptor antigenic himeric (CAR) care se leagă de o moleculă de suprafața celulară asociată cu tumoare (*de ex.*, mezotelina) sau o moleculă de suprafața celulară restricționată de origine (*de ex.*, CD19).

IV. Metode de tratare a pacienților

Metodele de tratament încep cu colectarea TIL inițială și cultivarea TIL. Aceste metode au fost descrise în domeniu, de exemplu, în Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35(3):283-292. Exemplele de metode de tratament sunt descrise în secțiunile de mai jos, inclusiv în Exemple.

TIL amplificate produse conform metodelor descrise în prezenta, inclusiv de exemplu cele descrise în Etapele A - F de mai sus sau conform Etapele A - F de mai sus (indicate, de exemplu, și în Figura 27), își găsesc utilizare specifică în tratamentul pacienților cu cancer (de exemplu, așa cum se descrie în Goff, et al., J. Clinical Oncology, 2016, 34(20):2389-239, precum și conținutul adițional. În unele aplicări, TIL au fost crescute din depozite rezecate din melanom metastatic descrise anterior (vezi Dudley, et al., J Immunother., 2003, 26:332-342). Tumoarea proaspătă poate fi disecată în condiții sterile. O probă reprezentativă poate fi colectată pentru analiză patologică. Se pot folosi fragmente individuale de 2 mm³ până la 3 mm³. Se pot obține 5, 10, 15, 20, 25 sau 30 de probe per pacient. Se pot obține 20, 25 sau 30 de probe per pacient. Se pot obține 20, 22, 24, 26 sau 28 de probe per pacient. Se pot obține 24 de probe per pacient. Probele pot fi introduse în godeuri individuale ale unei plăci cu 24 de godeuri, menținute în mediu de creștere cu IL-2 în doză mare (6.000 IU/mL) și monitorizate cu privire la distrugerea tumorii și/sau proliferarea TIL. Orice tumoare cu celule viabile rămase după procesare poate fi digerată enzimatic într-o singură suspensie celulară și crioconservată, așa cum se descrie în prezenta.

În unele aplicări, se pot preleva probe din TIL crescute cu succes pentru analiza fenotipului (CD3, CD4, CD8 și CD56) și testarea față de tumoare autologă, când este disponibilă. TIL pot fi considerate reactive dacă o co-cultură peste noapte a produs niveluri ale interferon-gamma (IFN- γ) > 200 pg/mL și de dori ori față de fond. (Goff, et al., J Immunother., 2010, 33:840-847). În unele aplicări, culturile cu dovezi de reactivitate autologă sau tipare de creștere suficientă pot fi selectate pentru o a doua expansiune (de exemplu, o a doua expansiune prevăzută conform etapei D din Figura 27), inclusiv a doua expansiune care este denumită uneori expansiune rapidă (REP). În unele aplicări, TIL amplificate cu reactivitate autologă mare (de exemplu, proliferare mare în a a doua expansiune), sunt selectate pentru o a doua expansiune suplimentară. În unele aplicări, TIL cu reactivitate autologă mare (de exemplu, proliferare mare în a doua expansiune, prevăzută în etapa D din Figura 27), sunt selectate pentru a doua expansiune suplimentară conform etapei D din Figura 27.

În unele aplicări, pacientul nu este adus direct la ACT (transfer celular adoptiv), de exemplu, în unele aplicări, după recoltarea tumorii și/sau o primă expansiune, celulele nu sunt utilizate imediat. În aceste aplicări, TIL pot fi crioconservate și decongelate cu 2 zile înaintea administrării la un pacient. În aceste aplicări, TIL pot fi crioconservate și decongelate cu 1 zi înaintea administrării la un pacient. În unele aplicări, TIL pot fi crioconservate și decongelate imediat înaintea administrării la un pacient.

Fenotipurile celulare ale probelor crioconservate de TIL din punga de perfuzie pot fi analizate prin citometrie în flux (*de ex.*, FlowJo) cu privire la markeri de suprafață CD3, CD4, CD8, CCR7 și CD45RA

(BD BioSciences), precum și prin oricare dintre metodele descrise în prezenta. Citokinele serice s-au măsurat folosind tehnici de analiză imunorobentă enzimatică standard. O creștere a IFN-g seric a fost definită ca >100 pg/mL și mai mare de 4-3 față de nivelurile de referință.

5 În unele aplicări, TIL produse prin metodele prevăzute în prezenta, de exemplu cele exemplificate în Figura 27, asigură o îmbunătățire semnificativă a eficienței clinice a TIL. În unele aplicări, TIL produse prin metodele prevăzute în prezenta, de exemplu cele exemplificate în Figura 27, prezintă eficiență clinică mărită față de TIL produse prin alte metode decât cele descrise în prezenta, inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele exemplificate în Figura 27. În unele aplicări, alte metode decât cele descrise în prezenta includ metode denumite procesul IC și/sau Generația 1 (Gen 1). În unele aplicări, eficiența mărită se măsoară prin DCR, ORR și/sau alte răspunsuri clinice. În unele aplicări, TIL produse prin metodele prevăzute în prezenta, de exemplu cele exemplificate în Figura 27, prezintă un timp de răspuns și profil de siguranță similare cu TIL produse prin alte metode decât cele descrise în prezenta, inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele exemplificate în Figura 27, de exemplu procesul Gen 1.

15 În unele aplicări, IFN-gamma (IFN- γ) indică eficiența tratamentului și/sau eficiență clinică mărită. În unele aplicări, IFN- γ din sângele subiecților tratați cu TIL indică TIL active. În unele aplicări, se utilizează un test de potențial pentru producția IFN- γ . Producția IFN- γ este o altă măsură a potențialului citotoxic. Producția IFN- γ poate fi măsurată prin determinarea nivelurilor de citokine IFN- γ în sânge, ser sau TIL *ex vivo* ale unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, o creștere a IFN- γ indică eficiența tratamentului la un pacient tratat cu TIL produse prin metodele din prezenta invenție. În unele aplicări, IFN- γ este mărit o dată, de două ori, trei ori, patru ori sau cinci ori sau de mai multe ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită o dată față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de două ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de trei ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de patru ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de cinci ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară folosind un kit Quantikine ELISA. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară în TIL *ex vivo* ale unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară în sângele unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară în ser TIL al unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27.

45 În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare indică eficiența tratamentului și/sau eficiență clinică mărită. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare în sângele subiecților tratați cu TIL indică TIL active. Producția IP-10 poate fi măsurată prin determinarea nivelurilor de IP-10 în sângele unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare indică eficiența tratamentului la un pacient tratat cu TIL produse prin metodele din prezenta invenție. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere o dată, de două ori, trei ori, patru ori sau cinci ori sau de mai multe ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere o dată față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere de două ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere de trei ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere de patru ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele

prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere de cinci ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 se măsoară în sângele unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27.

În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare indică eficiența tratamentului și/sau eficiență clinică mărită. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare în sângele subiecților tratați cu TIL indică TIL active. Producția MCP-1 poate fi măsurată prin determinarea nivelurilor de MCP-1 în sângele unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare indică eficiența tratamentului la un pacient tratat cu TIL produse prin metodele din prezenta invenție. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere o dată, de două ori, trei ori, patru ori sau cinci ori sau de mai multe ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere o dată față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere de trei ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere de patru ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere de cinci ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 se măsoară în sângele unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 se măsoară în ser TIL al unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27.

În unele aplicări, TIL prepared prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27, prezintă policlonalitate mărită față de TIL produse prin alte metode, inclusiv cele care nu sunt exemplificate în Figura 27, cum ar fi de exemplu, metode denumite procesul 1C. În unele aplicări, policlonalitatea îmbunătățită semnificativ și/sau policlonalitatea mărită indică eficiența tratamentului și/sau eficiență clinică mărită. În unele aplicări, policlonalitatea se referă la diversitatea repertoriului celulelor T. În unele aplicări, o creștere a policlonalității poate indica eficiența tratamentului cu privire la administrarea TIL produse prin metodele din prezenta invenție. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită o dată, de două ori, de zece ori, de 100 de ori, de 500 de ori sau de 1000 de ori față de TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta, inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită o dată față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită două ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită de zece ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită de 100 de ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită de 500 de ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită de 1000 de ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27.

Măsurătorile eficienței pot include măsurători ale ratei de combatere a bolii (DCR), precum și rata răspunsului total (ORR), cunoscute în domeniu și descrise în exemplele din prezenta, inclusiv Exemplul 28.

1. Metode de tratare a cancerelor și a altor boli

5 Metodele descrise în prezenta pot fi utilizate într-o metodă de tratare a bolilor. Într-o aplicare, se utilizează în tratarea tulburărilor hiperproliferative. Pot fi folosite de asemenea în tratarea altor afecțiuni descrise în prezenta și în următoarele paragrafe.

10 În unele aplicări, tulburarea hiperproliferativă este cancer. În unele aplicări, tulburarea hiperproliferativă este un cancer tumoral solid. În unele aplicări, cancerul tumoral solid este selectat din grupul constând din melanom, cancer ovarian, cancer de col uterin, cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer pulmonar, cancer vezical, cancer mamar, cancer cauzat de papilomavirus uman, cancer la cap și gât (inclusiv carcinom celular scuamos la cap și gât (HNSCC)), cancer renal și carcinom cu celule renale. În unele aplicări, tulburarea hiperproliferativă este o malignitate hematologică. În unele aplicări, cancerul tumoral solid este selectat din grupul constând din leucemie limfocitară cronică, leucemie limfoblastică acută, limfom difuz cu celule B mari, limfom non-Hodgkin, limfom Hodgkin, limfom folicular și limfom cu celule manta.

15 Se divulgă de asemenea în prezenta, dar fără a se revendica, o metodă de tratare a unui cancer cu o populație de TIL, unde un pacient este pre-tratat cu chimioterapie non-mieloablativă înaintea unei perfuzii de TIL conform prezentei invenții. Chimioterapia non-mieloablativă poate fi ciclofosamidă 60 mg/kg/zi timp de 2 zile (zilele 27 și 26 înaintea perfuziei TIL) și fludarabină 25 mg/m²/zi timp de 5 zile (zilele 27 până la 23 înaintea perfuziei TIL). După chimioterapia non-mieloablativă și perfuzia TIL (ziua 0) conform prezentei invenții, pacientul poate primi o perfuzie intravenoasă de IL-2 la 720.000 IU/kg din 8 în 8 ore până la toleranță fiziologică.

25 Eficiența compușilor și combinațiilor de compuși descriși în prezenta în tratarea, prevenirea și/sau controlul bolilor sau afecțiunilor indicate poate fi testată folosind diferite modele cunoscute în domeniu, reprezentând un ghid pentru tratarea bolii umane. De exemplu, modelele de determinare a eficienței tratamentelor pentru cancer ovarian sunt descrise, *de ex.*, în Mullany, et al., *Endocrinology* 2012, 153, 1585-92; și Fong, et al., *J. Ovarian Res.* 2009, 2, 12. Modelele de determinare a eficienței tratamentelor pentru cancer pancreatic sunt descrise în Herreros-Villanueva, et al., *World J. Gastroenterol.* 2012, 18, 1286-1294. Modelele de determinare a eficienței tratamentelor pentru cancer mamar sunt descrise, *de ex.*, în Fantozzi, *Breast Cancer Res.* 2006, 8, 212. Modelele de determinare a eficienței tratamentelor pentru melanom sunt descrise, *de ex.*, în Damsky, et al., *Pigment Cell & Melanom Res.* 2010, 23, 853-859. Modelele de determinare a eficienței tratamentelor pentru cancer pulmonar sunt descrise, *de ex.*, în Meuwissen, et al., *Genes & Development*, 2005, 19, 643-664. Modelele de determinare a eficienței tratamentelor pentru cancer pulmonar sunt descrise, *de ex.*, în Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2009, 2, 55-60; și Sano, *Head Neck Oncol.* 2009, 1, 32.

30 În unele aplicări, IFN-gamma (IFN- γ) indică eficiența tratamentului pentru tratarea afecțiunii hiperproliferative. În unele aplicări, IFN- γ în sângele subiecților tratați cu TIL indică TIL active. În unele aplicări, se utilizează un test de potențial pentru producția IFN- γ . Producția IFN- γ este o altă măsură a potențialului citotoxic. Producția IFN- γ poate fi măsurată prin determinarea nivelurilor de citokine IFN- γ în sângele unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, TIL obținute prin metoda din prezenta asigură IFN- γ mărit în sângele subiecților tratați cu TIL din metoda din prezenta comparativ cu subiecți tratați cu TIL preparate folosind metode denumite procesul 1C, exemplificat în Figura 83. În unele aplicări, o creștere a IFN- γ indică eficiența tratamentului la un pacient tratat cu TIL produse prin metodele din prezenta invenție. În unele aplicări, IFN- γ este mărit o dată, de două ori, trei ori, patru ori sau cinci ori sau de mai multe ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită o dată față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de două ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de trei ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de patru ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, secreția IFN- γ este mărită de cinci ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele

prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară folosind un kit Quantikine ELISA. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară folosind un kit Quantikine ELISA. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară în TIL *ex vivo* de la un pacient tratat cu TIL produse prin metodele din prezenta invenție. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară în sângele unui pacient tratat cu TIL produse prin metodele din prezenta invenție. În unele aplicări, IFN- γ se măsoară în serul unui pacient tratat cu TIL produse prin metodele din prezenta invenție.

În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare indică eficiența tratamentului și/sau eficiență clinică mărită pentru tratarea afecțiunii hiperproliferative. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare în sângele subiecților tratați cu TIL indică TIL active. În unele aplicări, TIL obținute prin metoda din prezenta asigură IP-10 mediu mai mare în sângele subiecților tratați cu TIL din metoda din prezenta comparativ cu subiecți tratați cu TIL preparate folosind metode denumite procesul 1C, exemplificat în Figura 83. Producția IP-10 poate fi măsurată prin determinarea nivelurilor de IP-10 în sângele unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare indică eficiența tratamentului la un pacient tratat cu TIL produse prin metodele din prezenta invenție. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere o dată, de două ori, trei ori, patru ori sau cinci ori sau de mai multe ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere de două ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere de trei ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere de patru ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, IP-10 mediu mai mare se corelează cu o creștere de cinci ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27.

În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare indică eficiența tratamentului și/sau eficiență clinică mărită pentru tratarea afecțiunii hiperproliferative. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare în sângele subiecților tratați cu TIL indică TIL active. În unele aplicări, TIL obținute prin metoda din prezenta asigură MCP-1 mediu mai mare în sângele subiecților tratați cu TIL din metoda din prezenta comparativ cu subiecți tratați cu TIL preparate folosind metode denumite procesul 1C, exemplificat în Figura 83. Producția MCP-1 poate fi măsurată prin determinarea nivelurilor de MCP-1 în sângele unui subiect tratat cu TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare indică eficiența tratamentului la un pacient tratat cu TIL produse prin metodele din prezenta invenție. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere o dată, de două ori, trei ori, patru ori sau cinci ori sau de mai multe ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere o dată față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere de două ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere de trei ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere de patru ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, MCP-1 mediu mai mare se corelează cu o creștere de cinci ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27.

În unele aplicări, TIL preparate prin metodele din prezenta invenție, inclusiv cele descrise de exemplu în Figura 27, prezintă policlonalitate mărită față de TIL produse prin alte metode, inclusiv cele care nu sunt exemplificate în Figura 27, cum ar fi de exemplu, metodele denumite procesul 1C. În unele

aplicări, policlonalitatea îmbunătățită semnificativ și/sau policlonalitatea mărită indică eficiența tratamentului și/sau eficiență clinică mărită pentru tratarea cancerului. În unele aplicări, policlonalitatea se referă la diversitatea repertoriului celulelor T. În unele aplicări, o creștere a policlonalității poate indica eficiența tratamentului cu privire la administrarea TIL produse prin metodele din prezenta invenție. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită o dată, de două ori, de zece ori, de 100 de ori, de 500 de ori sau de 1000 de ori față de TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită o dată față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită de două ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită de zece ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită de 100 de ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită de 500 de ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele reprezentate în Figura 27. În unele aplicări, policlonalitatea este mărită de 1000 de ori față de un pacient netratat și/sau față de un pacient tratat cu TIL preparate folosind alte metode decât cele prevăzute în prezenta inclusiv, de exemplu, alte metode decât cele reprezentate în Figura 27.

2. Metode de co-administrare

În unele aplicări, TIL produse așa cum se descrie în prezenta, inclusiv de exemplu TIL obținute dintr-o metodă descrisă în Etapele A - F din Figura 27, se pot administra în combinație cu unul sau mai mulți regulatori ai punctului de control imun, cum ar fi anticorpii descriși mai jos. De exemplu, anticorpii care țintesc PD-1 și care se pot co-administra cu TIL din prezenta invenție includ, *de ex.*, nelimitativ nivolumab (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), pembrolizumab (lambrolizumab, MK03475 sau MK-3475, Merck; Keytruda®), anticorp anti-PD-1 umanizat JS001 (ShangHai JunShi), anticorp anti-PD-1 monoclonal TSR-042 (Tesar, Inc.), Pidilizumab (anti-PD-1 mAb CT-011, Medivation), anticorp monoclonal anti-PD-1 BGB-A317 (BeiGene) și/sau anticorp anti-PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), anticorp monoclonal uman REGN2810 (Regeneron), anticorp monoclonal uman MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb) și/sau anticorp anti-PD-1 umanizat IgG4 PDR001 (Novartis). În unele aplicări, anticorpii PD-1 este din clona: RMP1-14 (IgG de șobolan) - BioXcell cat# BP0146. Alți anticorpi adecvați pentru utilizare în metode de co-administrare cu TIL produse conform Etapelor A - F descrise în prezenta sunt anticorpi anti-PD-1 descriși în brevetul U.S. nr. 8,008,449. În unele aplicări, anticorpii sau porțiunea sa de legare a antigenului se leagă specific de PD-L1 și îi inhibă interacțiunea cu PD-1, crescând activitatea imunitară. Orice anticorpi cunoscuți în domeniu care se leagă de PD-L1 și perturbă interacțiunea între PD-1 și PD-L1 și stimulează un răspuns imun anti-tumoral, sunt adecvați pentru utilizare în metode de co-administrare cu TIL produse conform Etapelor A - F descrise în prezenta. De exemplu, anticorpii care țintesc PD-L1 și sunt în teste clinice includ BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) și MPDL3280A (Genentech). Alți anticorpi adecvați care țintesc PD-L1 sunt descriși în brevetul U.S. nr. 7,943,743. Se va înțelege că orice anticorp care se leagă de PD-1 sau PD-L1, perturbă interacțiunea PD-1/PD-L1 și stimulează un răspuns imun anti-tumoral este adecvat pentru utilizare în metode de co-administrare cu TIL produse conform Etapelor A - F descrise în prezenta. Subiectului căruia i se administrează combinația de TIL produse conform Etapelor A - F i se poate co-administra un anticorp anti-PD-1 când pacientul are un tip de cancer refractar la administrarea doar a anticorpului anti-PD-1. Pacientului i se pot administra TIL în combinație și anti-PD-1 când pacientul are melanom refractar. Pacientului i se pot administra TIL în combinație și anti-PD-1 când pacientul are carcinom pulmonar macrocelular (NSCLC).

3. Precondiționarea cu limfodepleție opțională a pacienților

Se divulgă de asemenea în prezenta, dar fără a se revendica, o metodă de tratare a unui cancer cu o populație de TIL, unde un pacient este pre-tratat cu chimioterapie non-mieloablativă înaintea unei perfuzii de TIL conform prezentei invenții. Se divulgă de asemenea în prezenta, o populație de TIL pentru utilizare în tratamentul cancerului la un pacient care a fost pre-tratat cu chimioterapie non-mieloablativă. Populația de TIL poate fi administrată prin perfuzie. Chimioterapia non-mieloablativă poate fi ciclofosamidă 60 mg/kg/zi timp de 2 zile (zilele 27 și 26 înaintea perfuziei TIL) și fludarabină 25 mg/m²/zi timp de 5 zile (zilele 27 până la 23 înaintea perfuziei TIL). După chimioterapia non-mieloablativă și perfuzia TIL (ziua 0) conform prezentei invenții, pacientul poate primi o perfuzie intravenoasă de IL-2 (aldesleukina, disponibilă în comerț ca PROLEUKIN) la 720.000 IU/kg din 8 în 8 ore până la toleranță fiziologică.

Populația de TIL poate fi utilizată în tratarea cancerului în combinație cu IL-2, unde IL-2 se administrează după populația de TIL.

Observațiile experimentale arată că limfodepleția înaintea transferului adoptiv al limfocitelor T specifice tumorii are un rol esențial în creșterea eficienței tratamentului prin eliminarea celulelor T reglatoare și a elementelor concurente ale sistemului imunitar ('citokine sinks'). Astfel, o etapă de limfodepleție (denumită de asemenea uneori "condiționare imunosupresoare") poate fi utilizată la pacient înainte de introducerea TIL din invenție.

În general, limfodepleția se obține folosind administrarea fludarabinei sau ciclofosfamidei (forma activă fiind denumită mafosfamidă) și combinații ale acestora. Aceste metode sunt descrise în 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 și Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 2346-2357.

Fludarabina se poate administra la o concentrație de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ -10 $\mu\text{g/mL}$ fludarabină. Fludarabina se poate administra la o concentrație de 1 $\mu\text{g/mL}$ fludarabină. Tratamentul cu fludarabină se poate administra timp de 1 zi, 2 zile, 3 zile, 4 zile, 5 zile, 6 zile sau 7 zile sau mai mult. Fludarabina se poate administra la un dozaj de 10 mg/kg/zi, 15 mg/kg/zi, 20 mg/kg/zi, 25 mg/kg/zi, 30 mg/kg/zi, 35 mg/kg/zi, 40 mg/kg/zi sau 45 mg/kg/zi. Tratamentul cu fludarabină se poate administra timp de 2-7 zile la 35 mg/kg/zi. Tratamentul cu fludarabină se poate administra timp de 4-5 zile la 35 mg/kg/zi. Tratamentul cu fludarabină se poate administra timp de 4-5 zile la 25 mg/kg/zi.

Mafosfamida, forma activă a ciclofosfamidei, poate fi obținută la o concentrație de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ -10 $\mu\text{g/mL}$ prin administrarea ciclofosfamidei. Mafosfamida, forma activă a ciclofosfamidei, poate fi obținută la o concentrație de 1 $\mu\text{g/mL}$ prin administrarea ciclofosfamidei. Tratamentul cu ciclofosfamidă se poate administra timp de 1 zi, 2 zile, 3 zile, 4 zile, 5 zile, 6 zile sau 7 zile sau mai mult. Ciclofosfamida se poate administra la un dozaj de 100 mg/m²/zi, 150 mg/m²/zi, 175 mg/m²/zi, 200 mg/m²/zi, 225 mg/m²/zi, 250 mg/m²/zi, 275 mg/m²/zi sau 300 mg/m²/zi. Ciclofosfamida se poate administra intravenos (*i.e.*, *i.v.*). Tratamentul poate fi administra timp de 2-7 zile la 35 mg/kg/zi. Tratamentul cu ciclofosfamidă se poate administra timp de 4-5 zile la 250 mg/m²/zi *i.v.* Tratamentul cu ciclofosfamidă se poate administra timp de 4 zile la 250 mg/m²/zi *i.v.*

Limfodepleția se poate efectua prin administrarea fludarabinei și ciclofosfamidei împreună unui pacient. Fludarabina se poate administra la 25 mg/m²/zi *i.v.* și ciclofosfamida se administrează la 250 mg/m²/zi *i.v.* în 4 zile.

Limfodepleția se poate efectua prin administrarea ciclofosfamidei la o doză de 60 mg/m²/zi timp de două zile, urmată de administrarea fludarabinei la o doză de 25 mg/m²/zi timp de cinci zile.

4. Regimuri IL-2

Regimul IL-2 poate cuprinde un regim IL-2 în doză mare, unde regimul IL-2 în doză mare cuprinde aldesleukina, sau un biosimilar sau o variantă a acesteia, administrată intravenos începând cu ziua de după administrarea unei porțiuni eficiente terapeutic a populației terapeutice de TIL, unde aldesleukina sau un biosimilar sau o variantă a acesteia se administrează la o doză de 0.037 mg/kg sau 0.044 mg/kg IU/kg (masa corporală a pacientului) folosind perfuzie intravenoasă în bolus de 15 minute din opt în opt ore până la toleranță, pentru un maxim de 14 doze. După 9 zile de pauză, acest program poate fi repetat alte 14 doze, pentru un maxim de 28 de doze în total.

Regimul IL-2 poate cuprinde un regim IL-2 în scădere. Regimurile IL-2 în scădere au fost descrise în O'Day, et al., *J. Clin. Oncol.* 1999, 17, 2752-61 și Eton, et al., *Cancer* 2000, 88, 1703-9. Un regim IL-2 în scădere poate cuprinde 18×10^6 IU/m² administrat intravenos în 6 ore, urmat de 18×10^6 IU/m² administrat intravenos în 12 ore, urmat de 18×10^6 IU/m² administrat intravenos în 24 h, urmat de 4.5×10^6 IU/m² administrat intravenos în 72 de ore. Acest ciclu de tratament poate fi repetat la fiecare 28 de zile pentru un maxim de patru cicluri. Un regim de IL-2 în scădere poate cuprinde 18.000.000 IU/m² în ziua 1, 9.000.000 IU/m² în ziua 2 și 4.500.000 IU/m² în zilele 3 și 4.

Regimul IL-2 poate cuprinde administrarea IL-2 pegilat o dată la fiecare 1, 2, 4, 6, 7, 14 sau 21 zile la o doză de 0.10 mg/zi până la 50 mg/zi.

5. Transfer celular adoptiv

Transferul celular adoptiv (ACT) este o formă foarte eficientă de imunoterapie și presupune transfer de celule imunitare cu activitate antitumorală la pacienți cu cancer. ACT este o metodă de tratament care presupune identificarea, *in vitro*, a limfocitelor cu activitate antitumorală, expansiunea *in vitro* a acestor celule într-un număr mai mare și introducerea acestora în gazda purtătoare de cancer. Limfocitele folosite pentru transfer adoptiv pot proveni din stroma tumorilor rezecate (limfocite infiltrante în tumori sau TIL). TIL pentru ACT pot fi preparate așa cum se descrie în prezenta. În unele aplicări, TIL se prepară, de exemplu, conform unei metode descrise în Figura 27. Pot proveni de asemenea din sânge dacă sunt modificate genetic pentru a exprima receptori T celulari (TCR) sau receptori antigenici himerici (CAR)

antitumorali, îmbogățite cu culturi de celule tumorale limfocitare mixte (MLTC) sau clonate folosind celule de prezentare a antigenului autologe și peptide derivate din tumoare. ACT în care limfocitele provin din gazda purtătoare a cancerului este denumit ACT autolog. Documentația U.S. nr. 2011/0052530 se referă la o metodă de efectuare a terapiei celulare adoptive pentru a favoriza regresia cancerului, în primul rând pentru tratarea pacienților care suferă de melanom metastatic. TIL se pot administra așa cum se descrie în prezenta. TIL se pot administra într-o singură doză. Această administrare poate fi prin injecție, *de ex.*, injecție intravenoasă. În unele aplicări, TIL și/sau limfocitele citotoxice se pot administra în doze multiple. Dozajul poate fi o dată, de două ori, de trei ori, de patru ori, de cinci ori, de șase ori sau de mai multe ori pe an. Dozajul poate fi o dată pe lună, o dată la două săptămâni, o dată pe săptămână sau o dată la două zile. Administrarea TIL și/sau a limfocitelor citotoxice poate continua atât cât este necesar.

6. Tratamente exemplificative

Prezenta invenție include o metodă de tratare a unui cancer cu o populație de limfocite infiltrante în tumori (TIL) cuprinzând etapele de (a) obținere a unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un pacient; (b) efectuarea unei expansiuni inițiale a primei populații de TIL într-un prim mediu de cultură celulară pentru a obține o a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL este cel puțin de 5 ori mai mare în număr decât prima populație de TIL și unde primul mediu de cultură celulară cuprinde IL-2; (c) efectuarea unei expansiuni rapide a celei de-a doua populații de TIL folosind o populație de celule de prezentare a antigenului mioeloide artificiale (aAPC mioeloide) într-un al doilea mediu de cultură celulară pentru a obține o a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât a doua populație de TIL după 7 zile de la inițierea expansiunii rapide; și unde al doilea mediu de cultură celulară cuprinde IL-2 și OKT-3; (d) administrarea unei porțiuni eficiente terapeutic a celei de-a treia populații de TIL la un pacient cu cancer. Prezenta invenție include de asemenea o populație de limfocite infiltrante în tumori (TIL) pentru utilizare în tratarea cancerului, unde populația de TIL este obținută printr-o metodă cuprinzând etapele de (b) efectuare a unei expansiuni inițiale a unei prime populații de TIL obținute dintr-o tumoare rezecată de la un pacient într-un prim mediu de cultură celulară pentru a obține o a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL este cel puțin de 5 ori mai mare în număr decât prima populație de TIL și unde primul mediu de cultură celulară cuprinde IL-2; (c) efectuarea unei expansiuni rapide a celei de-a doua populații de TIL folosind o populație de celule de prezentare a antigenului mioeloide artificiale (aAPC mioeloide) într-un al doilea mediu de cultură celulară pentru a obține o a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât a doua populație de TIL după 7 zile de la inițierea a expansiunii rapide; și unde al doilea mediu de cultură celulară cuprinde IL-2 și OKT-3; (d) administrarea unei porțiuni eficiente terapeutic a celei de-a treia populații de TIL la un pacient cu cancer. Metoda poate cuprinde o primă etapă (a) de obținere a primei populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un pacient. IL-2 poate fi prezentă la o concentrație inițială de circa 3000 IU/mL și anticorpul OKT-3 este prezent la o concentrație inițială de circa 30 ng/mL în al doilea mediu de cultură celulară. Prima expansiune se poate efectua într-o perioadă nu mai mare de 14 zile. Prima expansiune se poate efectua folosind un recipient permeabil la gaz. A doua expansiune se poate efectua folosind un recipient permeabil la gaz. Raportul celei de-a doua populații de TIL la populația de aAPC în expansiunea rapidă poate fi între 1 până la 80 și 1 până la 400. Raportul celei de-a doua populații de TIL la populația de aAPC în expansiunea rapidă poate fi circa 1 până la 300. Cancerul pentru tratament poate fi selectat din grupul constând din melanom, cancer ovarian, cancer de col uterin, cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer pulmonar, cancer de vezică, cancer mamar, cancer cauzat de papilomavirus uman, cancer la cap și gât (inclusiv carcinom celular scuamos la cap și gât (HNSCC)), cancer renal și carcinom cu celule renale. Cancerul pentru tratament poate fi selectat din grupul constând din melanom, cancer ovarian și cancer de col uterin. Cancerul pentru tratament poate fi melanom. Cancerul pentru tratament poate fi cancer ovarian. Cancerul pentru tratament poate fi cancer de col uterin. Metoda de tratare a cancerului mai poate cuprinde etapa de tratare a pacientului cu un regim de limfodepleție non-mieloablativ înaintea administrării celei de-a treia populații de TIL la pacient. Regimul de limfodepleție non-mieloablativ poate cuprinde etapele de administrare a ciclofosfamidei la o doză de 60 mg/m²/zi timp de două zile, urmată de administrarea fludarabinei la o doză de 25 mg/m²/zi timp de cinci zile. Regimul IL-2 în doză mare cuprinde 600.000 sau 720.000 IU/kg de aldesleukină, sau un biosimilar sau o variantă a acesteia, administrată ca o perfuzie intravenoasă în bolus în 15 minute din opt în opt ore până la toleranță.

V. Exemple

Prezenta invenție include, dar nu revendică, o metodă de tratare a unui subiect cu cancer, metoda cuprinzând administrarea limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) amplificate cuprinzând:

- (a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;
- (b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

(c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 11 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 11 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului;

(g) crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (f) folosind un proces de crioconservare; și

(h) administrarea unui dozaj terapeutic eficient din a treia populație de TIL din punga de perfuzie în etapa (g) la pacient.

Procesul de crioconservare poate cuprinde crioconservare într-un mediu cuprinzând DMSO. Mediul de crioconservare poate cuprinde 7% până la 10% DMSO. Mediul de crioconservare poate fi CS10.

Populația terapeutică de TIL recoltată în etapa (e) poate cuprinde suficiente TIL pentru administrarea unui dozaj terapeutic eficient al TIL în etapa (h).

Numărul de TIL suficient pentru administrarea unui dozaj terapeutic eficient în etapa (h) poate fi de la circa 2.3×10^{10} până la circa 13.7×10^{10} .

Celulele de prezentare a antigenului (APC) pot fi PBMC.

PBMC pot fi adăugate în cultura celulară în oricare dintre zilele 9 - 11 în etapa (d).

Înainte administrării unui dozaj terapeutic eficient de celule TIL în etapa (h), poate să fi fost administrat la pacient un regim de limfodepleție non-mieloablative.

Regimul de limfodepleție non-mieloablative poate cuprinde etapele de administrare a ciclofosfamidei la o doză de $60 \text{ mg/m}^2/\text{zi}$ timp de două zile, urmată de administrarea fludarabinei la o doză de $25 \text{ mg/m}^2/\text{zi}$ timp de cinci zile.

Metoda mai poate cuprinde etapa de tratare a pacientului cu un regim IL-2 în doză mare începând cu ziua de după administrarea celulelor TIL la pacient în etapa (h).

Regimul IL-2 în doză mare poate cuprinde 600.000 sau 720.000 IU/kg administrat ca o perfuzie intravenoasă în bolus în 15 minute din opt în opt ore până la toleranță.

A treia populație de TIL în etapa (d) poate asigura eficiență mărită, producție interferon-gamma (IFN- γ) mărită, policlonalitate mărită, IP-10 mediu mărit și/sau MCP-1 mediu mărit la administrare la un subiect. Creșterea IFN- γ , IP-10 mediu mărit și/sau MCP-1 mediu mărit se pot măsura în sângele subiectului tratat cu TIL.

Cancerul poate fi selectat din grupul constând din melanom, cancer ovarian, cancer de col uterin, cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer pulmonar, cancer de vezică, cancer mamar, cancer cauzat de papilomavirus uman, cancer la cap și gât (inclusiv carcinom celular scuamos la cap și gât (HNSCC)), cancer renal și carcinom cu celule renale. Cancerul poate fi selectat din grupul constând din melanom, HNSCC, cancer de col uterin și NSCLC. Cancerul poate fi melanom. Cancerul poate fi HNSCC. Cancerul poate fi un cancer de col uterin. Cancerul poate fi NSCLC.

Într-o aplicare, invenția prevede o metodă de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL).

Se divulgă în prezenta o metodă de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) cuprinzând: (a) obținerea unei probe tumorale de la un pacient, unde proba tumorală respectivă cuprinde o primă populație de TIL; (b) procesarea probei tumorale în mai multe fragmente tumorale; (c) adăugarea fragmentelor tumorale într-un recipient închis; (d) efectuarea unei expansiuni inițiale a primei populații de TIL într-un prim mediu de cultură celulară pentru a obține o a doua populație de TIL, unde primul mediu de cultură celulară cuprinde IL-2, unde expansiunea inițială se efectuează în recipientul închis care asigură cel puțin 100 cm^2 de suprafață permeabilă la gaz, unde expansiunea inițială se efectuează într-o primă perioadă de circa 7-14 zile pentru a obține o a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului; (e) amplificarea celei de-a doua populații de TIL într-un al doilea mediu de cultură celulară, unde al doilea mediu de cultură celulară cuprinde IL-2, OKT-3 și celule

mononucleare din sângele periferic (PBMC, cunoscute și ca celule mononucleare (MNC)), unde expansiunea se efectuează într-o a doua perioadă de circa 7-14 zile pentru a obține o a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL prezintă o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde expansiunea se efectuează într-un recipient închis care asigură cel puțin 500 cm² de suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; (f) recoltarea celei de-a treia populații de TIL obținute de la etapa (e), unde tranziția de la etapa (e) la etapa (f) are loc fără deschiderea sistemului; și (g) transferul populației TIL recoltate de la etapa (f) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (f) la (g) are loc fără deschiderea sistemului. Metoda poate fi o metodă *in vitro* sau o metodă *ex vivo*.

Metoda mai poate cuprinde recoltarea în etapa (f), printr-un sistem de procesare celulară, cum ar fi sistemul LOVO fabricat de Fresenius Kabi. Termenul "sistem de procesare celulară LOVO" se referă de asemenea la orice instrument sau dispozitiv fabricate de orice furnizor, care poate pompa o soluție conținând celule printr-o membrană sau un filtru, cum ar fi o membrană sau filtru de centrifugare într-un mediu de sistem steril și/sau închis, permițând fluxul continuu și procesarea celulară pentru a îndepărta supernatantul sau mediul de cultură celulară fără peletizare. În unele cazuri, sistemul de procesare celulară poate efectua separarea celulelor, spălare, schimb de fluid, concentrare și/sau alte etape de procesare celulară într-un sistem steril, închis.

Recipientul închis poate fi selectat din grupul constând dintr-un recipient G și o pungă celulară Xuri.

Punga de perfuzie în etapa (g) poate fi o pungă de perfuzie conținând HypoThermosol.

Prima perioadă în etapa (d) și a doua perioadă în etapa (e) se pot efectua fiecare individual într-o perioadă de 10 zile, 11 zile sau 12 zile.

Prima perioadă în etapa (d) și a doua perioadă în etapa (e) se pot efectua fiecare individual într-o perioadă de 11 zile.

Etapele (a) până la (g) se pot efectua într-o perioadă de circa 25 zile până la circa 30 zile.

Etapele (a) până la (g) se pot efectua într-o perioadă de circa 20 zile până la circa 25 zile.

Etapele (a) până la (g) se pot efectua într-o perioadă de circa 20 zile până la circa 22 zile.

Etapele (a) până la (g) se pot efectua în 22 zile sau mai puțin.

Etapele (c) până la (f) se pot efectua într-un singur recipient, unde efectuarea etapelor (c) până la (f) într-un singur recipient duce la o creștere a producției TIL per tumoare rezecată față de efectuarea etapelor (c) până la (f) în mai multe recipiente.

PBMC se pot adăuga în TIL în a doua perioadă în etapa (e) fără deschiderea sistemului.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a treia populație de TIL pot prezenta una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a treia populație de TIL pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Riscul de contaminare microbiană poate fi redus față de un sistem deschis.

TIL de la etapa (g) pot fi administrate prin perfuzie unui pacient.

Se divulgă în prezenta, dar fără a se revendica, o metodă de tratare a cancerului la un pacient cu o populație de limfocite infiltrante în tumori (TIL) cuprinzând etapele de: (a) obținere a unei probe tumorale de la un pacient, unde proba tumorală respectivă cuprinde o primă populație de TIL; (b) procesarea probei tumorale în mai multe fragmente tumorale; (c) adăugarea fragmentelor tumorale într-un recipient închis; (d) efectuarea unei expansiuni inițiale a primei populații de TIL într-un prim mediu de cultură celulară pentru a obține o a doua populație de TIL, unde primul mediu de cultură celulară cuprinde IL-2, unde expansiunea inițială se efectuează în recipientul închis care asigură cel puțin 100 cm² de suprafață permeabilă la gaz, unde expansiunea inițială se efectuează într-o primă perioadă de circa 7-14 zile pentru a obține o a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului; (e) amplificarea celei de-a doua populații de TIL într-un al doilea mediu de cultură celulară, unde al doilea mediu de cultură celulară cuprinde IL-2, OKT-3 și celule mononucleare din sângele periferic (PBMC), unde expansiunea se efectuează într-o a doua perioadă de circa 7-14 zile pentru a obține o a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL prezintă o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde expansiunea se efectuează într-un recipient închis care asigură cel puțin 500 cm² de suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; (f) recoltarea celei de-a treia populații de TIL obținute de la etapa (e), unde tranziția de la etapa (e) la etapa (f) are loc fără deschiderea sistemului; (g) transferul

populației TIL recoltate de la etapa (f) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (f) la (g) are loc fără deschiderea sistemului; și (h) administrarea unei cantități eficiente terapeutic de celule TIL din punga de perfuzie în etapa (g) la pacient.

Se divulgă de asemenea în prezenta, dar fără a se revendica, o populație de limfocite infiltrante în tumori (TIL) pentru utilizare în tratarea cancerului, unde populația de TIL se obține dintr-o metodă cuprinzând etapele de: (b) procesare a unei probe tumorale obținute de la un pacient, unde proba tumorală cuprinde o primă populație de TIL în mai multe fragmente tumorale; (c) adăugarea fragmentelor tumorale într-un recipient închis; (d) efectuarea unei expansiuni inițiale a primei populații de TIL într-un prim mediu de cultură celulară pentru a obține o a doua populație de TIL, unde primul mediu de cultură celulară cuprinde IL-2, unde expansiunea inițială se efectuează în recipientul închis care asigură cel puțin 100 cm² de suprafață permeabilă la gaz, unde expansiunea inițială se efectuează într-o primă perioadă de circa 7-14 zile pentru a obține o a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului; (e) amplificarea celei de-a doua populații de TIL într-un al doilea mediu de cultură celulară, unde al doilea mediu de cultură celulară cuprinde IL-2, OKT-3 și celule mononucleare din sângele periferic (PBMC), unde expansiunea se efectuează într-o a doua perioadă de circa 7-14 zile pentru a obține o a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL prezintă o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde expansiunea se efectuează într-un recipient închis care asigură cel puțin 500 cm² de suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; (f) recoltarea celei de-a treia populații de TIL obținute de la etapa (e), unde tranziția de la etapa (e) la etapa (f) are loc fără deschiderea sistemului; (g) transferul populației TIL recoltate de la etapa (f) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (f) la (g) are loc fără deschiderea sistemului. Metoda poate cuprinde o primă etapă de (a) obținere a probei tumorale de la un pacient, unde proba tumorală respectivă cuprinde prima populație de TIL. Populația de TIL poate fi prevăzută pentru administrare din punga de perfuzie în etapa (g) într-o cantitate eficientă terapeutic.

Înainte de administrarea unei cantități eficiente terapeutic de celule TIL în etapa (h), poate să fi fost administrat la pacient un regim de limfodepleție non-mieloablativ. Populațiile TIL pot fi prevăzute pentru administrare la un pacient care a suferit un regim de limfodepleție non-mieloablativ.

Regimul de limfodepleție non-mieloablativ poate cuprinde etapele de administrare a ciclofosfamidei la o doză de 60 mg/m²/zi timp de două zile, urmată de administrarea fludarabinei la o doză de 25 mg/m²/zi timp de cinci zile.

Metoda mai poate cuprinde etapa de tratare a pacientului cu un regim IL-2 în doză mare începând cu ziua de după administrarea celulelor TIL la pacient în etapa (h). În unele aplicări, populațiile TIL pot fi prevăzute pentru administrare înainte de un regim IL-2 în doză mare. În unele aplicări, populația TIL poate fi prevăzută pentru administrare cu o zi înaintea debutului regimului IL-2 în doză mare.

Regimul IL-2 în doză mare poate cuprinde 600.000 sau 720.000 IU/kg administrat ca o perfuzie intravenoasă în bolus în 15 minute din opt în opt ore până la toleranță.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a treia populație de TIL pot prezenta una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a treia populație de TIL pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Se divulgă de asemenea în prezenta o metodă de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) cuprinzând etapele de (a) adăugare a fragmentelor tumorale procesate într-un sistem închis; (b) efectuarea unei prime expansiuni a primei populații de TIL într-un prim mediu de cultură celulară pentru a obține o a doua populație de TIL, unde primul mediu de cultură celulară cuprinde IL-2, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează într-o primă perioadă de circa 3-14 zile pentru a obține o a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (a) la etapa (b) are loc fără deschiderea sistemului; (c) amplificarea celei de-a doua populații de TIL într-un al doilea mediu de cultură celulară, unde al doilea mediu de cultură celulară cuprinde IL-2, OKT-3 și celulele de prezentare a antigenului, unde expansiunea se efectuează într-o a doua perioadă de circa 7-14 zile pentru a obține o a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL prezintă o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde expansiunea se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului; (d) recoltarea celei de-a treia populații de TIL obținute de la etapa (c), unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d)

are loc fără deschiderea sistemului; și (e) transferul populației TIL recoltate de la etapa (d) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (d) la (e) are loc fără deschiderea sistemului.

Metoda mai poate cuprinde etapa de crioconservare a pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată folosind un proces de crioconservare. Procesul de crioconservare se poate efectua folosind un raport 1:1 între populația TIL recoltată și mediul CS10.

Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule mononucleare din sângele periferic (PBMC). Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule de prezentare a antigenului artificiale.

Recoltarea din etapa (d) se poate efectua folosind un sistem de procesare celulară LOVO.

Fragmentele multiple pot cuprinde circa 50 fragmente, unde fiecare fragment are un volum de circa 27 mm³. Fragmentele multiple pot cuprinde circa 30 până la circa 60 fragmente cu un volum total de circa 1300 mm³ până la circa 1500 mm³. Fragmentele multiple pot cuprinde circa 50 fragmente cu un volum total de circa 1350 mm³. Fragmentele multiple pot cuprinde circa 50 fragmente cu o masă totală de circa 1 gram până la circa 1.5 grame.

Al doilea mediu de cultură celulară poate fi prevăzut într-un recipient selectat din grupul constând dintr-un recipient G și o pungă celulară Xuri.

Punga de perfuzie în etapa (e) poate fi o pungă de perfuzie conținând HypoThermosol.

Prima perioadă în etapa (b) și a doua perioadă în etapa (c) se pot efectua fiecare individual într-o perioadă de 10 zile, 11 zile sau 12 zile. Prima perioadă în etapa (b) și a doua perioadă în etapa (c) se pot efectua fiecare individual într-o perioadă de 11 zile.

Etapele (a) până la (e) se pot efectua într-o perioadă de circa 25 zile până la circa 30 zile. Etapele (a) până la (e) se pot efectua într-o perioadă de circa 20 zile până la circa 25 zile. Etapele (a) până la (e) se pot efectua într-o perioadă de circa 20 zile până la circa 22 zile. Etapele (a) până la (e) se pot efectua în 22 zile sau mai puțin. Etapele (a) până la (e) și crioconservarea se pot efectua în 22 zile sau mai puțin.

Etapele (b) până la (e) se pot efectua într-un singur sistem închis, unde efectuarea etapelor (b) până la (e) într-un singur recipient duce la o creștere a producției TIL per tumoare rezecată față de efectuarea etapelor (b) până la (e) în mai multe recipiente.

Celulele de prezentare a antigenului se pot adăuga în TIL în a doua perioadă în etapa (c) fără deschiderea sistemului.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a treia populație de TIL pot prezenta una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a treia populație de TIL pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Riscul de contaminare microbiană poate fi redus față de un sistem deschis.

TIL de la etapa (e) pot fi administrate prin perfuzie unui pacient.

Recipientul închis poate cuprinde un singur bioreactor. În unele aplicări, recipientul închis poate cuprinde G-REX-10. Recipientul închis poate cuprinde G-REX-100. Recipientul închis poate cuprinde G-Rex 500. Recipientul închis poate cuprinde un recipient permeabil la gaz Xuri sau Wave.

Prezenta invenție prevede o metodă de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) într-o populație terapeutică de TIL cuprinzând:

(b) adăugarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis, unde fragmentele tumorale cuprind o primă populație de TIL;

(c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului.

Metoda mai poate cuprinde ca o primă etapă:

5 (a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un pacient prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale.

Metoda poate fi o metodă *in vitro* sau o metodă *ex vivo*.

Prezenta invenție poate prevedea o metodă de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) într-o populație terapeutică de TIL cuprinzând:

10 (a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un pacient prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

(b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

15 (c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

20 (d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

25 (e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului.

Metoda poate fi o metodă *in vitro* sau o metodă *ex vivo*.

30 Metoda mai poate cuprinde etapa de crioconservare a pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată în etapa (f) folosind un proces de crioconservare.

35 Procesul de crioconservare se poate efectua folosind un raport 1:1 între populația TIL recoltată și mediul de crioconservare. Mediul de crioconservare poate cuprinde dimetilsulfoxid. Mediul de crioconservare poate fi selectat din grupul constând din Cryostor CS10, HypoThermasol sau o combinație a acestora.

Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule mononucleare din sângele periferic (PBMC).

PBMC pot fi iradiate și alogene.

PBMC pot fi adăugate în cultura celulară în oricare dintre zilele 9 - 14 în etapa (d).

40 Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule de prezentare a antigenului artificiale.

Recoltarea din etapa (e) poate fi efectuată folosind un sistem de procesare celulară LOVO.

45 Fragmentele tumorale pot fi fragmente multiple și cuprind circa 4 până la circa 50 fragmente, unde fiecare fragment are un volum de circa 27 mm³. Fragmentele multiple pot cuprinde circa 30 până la circa 60 fragmente cu un volum total de circa 1300 mm³ până la circa 1500 mm³. Fragmentele multiple pot cuprinde circa 50 fragmente cu un volum total de circa 1350 mm³. Fragmentele multiple pot cuprinde circa 50 fragmente cu o masă totală de circa 1 gram până la circa 1.5 grame.

Mediul de cultură celulară poate fi prevăzut într-un recipient selectat din grupul constând dintr-un recipient G și o pungă celulară Xuri.

Punga de perfuzie în etapa (f) poate fi o pungă de perfuzie conținând HypoThermosol.

50 Prima perioadă în etapa (c) și a doua perioadă în etapa (e) se pot efectua fiecare individual într-o perioadă de 10 zile, 11 zile sau 12 zile. Prima perioadă în etapa (c) și a doua perioadă în etapa (e) se pot efectua fiecare individual într-o perioadă de 11 zile. Etapele (a) până la (f) se pot efectua într-o perioadă de circa 25 zile până la circa 30 zile. Etapele (a) până la (f) se pot efectua într-o perioadă de circa 20 zile până la circa 25 zile. Etapele (a) până la (f) se pot efectua într-o perioadă de circa 20 zile până la circa 22 zile. Etapele (a) până la (f) se pot efectua în 22 zile sau mai puțin. Etapele (a) până la (f) și crioconservarea se pot efectua în 22 zile sau mai puțin.

55 Populația terapeutică de TIL recoltată în etapa (e) poate cuprinde suficiente TIL pentru un dozaj terapeutic eficient al TIL. Numărul de TIL suficient pentru un dozaj terapeutic eficient poate fi de la circa 2.3×10^{10} până la circa 13.7×10^{10} .

Etapela (b) până la (e) se pot efectua într-un singur recipient, unde efectuarea etapelor (b) până la (e) într-un singur recipient duce la o creștere a producției TIL per tumoare rezecată față de efectuarea etapelor (b) până la (e) în mai multe recipiente.

5 Celulele de prezentare a antigenului se pot adăuga în TIL în a doua perioadă în etapa (d) fără deschiderea sistemului.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală în populația terapeutică de TIL pot prezenta una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

10 Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a treia populație de TIL pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Riscul de contaminare microbiană poate fi redus față de un sistem deschis.

TIL de la etapa (f) pot fi administrate prin perfuzie unui pacient.

15 Fragmente multiple pot cuprinde circa 4 fragmente. Cele 4 fragmente pot fi introduse într-un G-REX -100. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 0.5 cm. Cele 4 fragmente pot fi introduse într-un G-REX -100. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 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 sau 1 cm. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 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 sau 1 cm și se pot introduce într-un G-REX -100. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 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 sau 1 cm și se pot introduce într-un recipient cu un vomul echivalent cu G-REX -100. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 0.5 cm și se pot introduce într-un G-REX -100. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 0.5 cm și se pot introduce într-un recipient cu un vomul echivalent cu G-REX -100.

25 Alte detalii privind etapele (a), (b), (c), (d), (e) și (f) sunt prevăzute mai jos, inclusiv de exemplu, nelimitativ, aplicările descrise în secțiunile "ETAPA A: Obținerea probei tumorale de la pacient", "ETAPA B: Prima expansiune", "ETAPA C: Tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune", "ETAPA D: A doua expansiune", "ETAPA E: Recoltarea TIL" și "ETAPA F: Compoziție finală / transfer în punga de perfuzie".

30 Prezenta invenție prevede metode de tratare a unui subiect cu cancer, metoda cuprinzând administrarea limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) amplificate cuprinzând:

(a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

(b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

35 (c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

40 (d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

45 (f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului;

(g) opțional crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (f) folosind un proces de crioconservare; și

(h) administrarea unui dozaj terapeutic eficient din a treia populație de TIL din punga de perfuzie în etapa (g) la pacient.

55 Se divulgă de asemenea în prezenta, dar nu este revendicată, o populație terapeutică de limfocite infiltrante în tumori (TIL) pentru utilizare în tratarea cancerului, unde populația se obține dintr-o metodă cuprinzând etapele:

(b) adăugarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis, unde fragmentele tumorale cuprind o primă populație de TIL;

(c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului; și

(g) opțional crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (f) folosind un proces de crioconservare.

Populația poate fi obținută printr-o metodă cuprinzând de asemenea ca o primă etapă:

(a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un pacient prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale.

Metoda poate fi o metodă *in vitro* sau o metodă *ex vivo*.

Oricare dintre etapele (a) - (f) pot cuprinde una sau mai multe caracteristici divulgate în prezenta, de ex. una sau mai multe caracteristici divulgate în secțiunile "ETAPA A: Obținerea probei tumorale de la pacient", "ETAPA B: Prima expansiune", "ETAPA C: Tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune", "ETAPA D: A doua expansiune", "ETAPA E:

Recoltarea TIL" și "ETAPA F: Compoziție finală / transfer în punca de perfuzie".

Etapa (g) poate cuprinde una sau mai multe caracteristici divulgate în prezenta, de ex. una sau mai multe caracteristici divulgate în secțiunea "ETAPA H: Crioconservare opțională TIL". Etapa (h) poate fi cuprinde una sau mai multe caracteristici divulgate în prezenta, de ex. una sau mai multe caracteristici divulgate în secțiunea "ETAPA F:1 Compoziții farmaceutice, dozaje și regimuri de dozaj".

Populația terapeutică de TIL recoltată în etapa (e) poate cuprinde suficiente TIL pentru administrarea unui dozaj terapeutic eficient al TIL în etapa (h).

Numărul de TIL suficient pentru administrarea unui dozaj terapeutic eficient în etapa (h) poate fi de la circa 2.3×10^{10} până la circa 13.7×10^{10} .

Celulele de prezentare a antigenului (APC) pot fi PBMC.

PBMC pot fi adăugate în cultura celulară în oricare dintre zilele 9 - 14 în etapa (d).

Înainte administrării unui dozaj terapeutic eficient de celule TIL în etapa (h), poate să fi fost administrat la pacient un regim de limfodepleție non-mieloablativ.

Se divulgă de asemenea în prezenta, dar nu este revendicată, o populație terapeutică de limfocite infiltrante în tumori (TIL) pentru utilizare în tratamentul cancerului și în combinație cu un regim de limfodepleție non-mieloablativ. Regimul de limfodepleție non-mieloablativ se poate administra înainte administrării populației terapeutice de limfocite infiltrante în tumori (TIL).

Regimul de limfodepleție non-mieloablativ poate cuprinde etapele de administrare a ciclofosfamidei la o doză de $60 \text{ mg/m}^2/\text{zi}$ timp de două zile, urmată de administrarea fludarabinei la o doză de $25 \text{ mg/m}^2/\text{zi}$ timp de cinci zile.

Există o etapă de tratare a pacientului cu un regim IL-2 în doză mare începând cu ziua de după administrarea celulelor TIL la pacient în etapa (h).

Se divulgă de asemenea în prezenta o populație terapeutică de limfocite infiltrante în tumori (TIL) pentru utilizare în tratamentul cancerului și în combinație cu regim IL-2 în doză mare. Regimul IL-2 în doză mare poate începe în ziua de după administrarea populației terapeutice de celule TIL.

Regimul IL-2 în doză mare poate cuprinde 600.000 sau 720.000 IU/kg administrat ca o perfuzie intravenoasă în bolus în 15 minute din opt în opt ore până la toleranță.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală în populația terapeutică de TIL pot prezenta una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală în populația terapeutică de TIL pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Prezenta invenție prevede de asemenea metode de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) într-o populație terapeutică de TIL cuprinzând:

(a) adăugarea fragmentelor tumorale procesate dintr-o tumoare rezecată de la un pacient într-un sistem închis pentru a obține o primă populație de TIL;

(b) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (a) la etapa (b) are loc fără deschiderea sistemului;

(c) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (c), unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului; și

(e) transferul populației TIL recoltate de la etapa (d) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (d) la (e) are loc fără deschiderea sistemului.

Populația terapeutică de TIL recoltată în etapa (d) poate cuprinde suficiente TIL pentru un dozaj terapeutic eficient al TIL.

Numărul de TIL suficient pentru un dozaj terapeutic eficient poate fi de la circa 2.3×10^{11} până la circa 13.7×10^{10} .

Metoda mai poate cuprinde etapa de crioconservare a pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată folosind un proces de crioconservare.

Procesul de crioconservare se poate efectua folosind un raport 1:1 între populația TIL recoltată și mediul CS10.

Prezenta invenție include metode de tratare a unui subiect cu cancer, metoda cuprinzând administrarea limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) amplificate cuprinzând:

(a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

(b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

(c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului;

(g) opțional crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (f) folosind un proces de crioconservare; și

(h) administrarea unui dozaj terapeutic eficient din a treia populație de TIL din punga de perfuzie în etapa (g) la pacient,

unde nu se realizează selecție a populației TIL în nici una dintre etapele (a) - (h). Nu se realizează selecție a celei de-a doua populații de TIL (populația pre-REP) pe baza fenotipului înainte de efectuarea celei de-a doua expansiuni din Etapa (d). Nu se realizează selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL sau a populației TIL recoltate pe baza expresiei CD8 poate fi efectuată în timpul oricăreia dintre etapele (a) - (h).

Prezenta invenție prevede, de asemenea, metode de tratare a unui subiect cu cancer, metoda cuprinzând administrarea limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) amplificate cuprinzând:

(a) obținerea unei prime populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect prin procesarea unei probe tumorale obținute de la pacient în mai multe fragmente tumorale;

(b) adăgarea fragmentelor tumorale într-un sistem închis;

(c) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de circa 3-14 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de circa 7-14 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) recoltarea populației terapeutice de TIL obținute de la etapa (d), unde tranziția de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) transferul populației TIL recoltate de la etapa (e) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (e) la (f) are loc fără deschiderea sistemului;

(g) crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (f) folosind un proces de crioconservare, unde procesul de crioconservare cuprinde amestecarea unui mediu de crioconservare cu populația TIL recoltată;

(h) administrarea unui dozaj terapeutic eficient din a treia populație de TIL din punga de perfuzie în etapa (g) la pacient, unde nu se realizează selecție a populației TIL în nici una dintre etapele (a) - (h). Nu se realizează selecție a celei de-a doua populații de TIL (de exemplu, populația pre-REP) pe baza fenotipului înainte de efectuarea celei de-a doua expansiuni din Etapa (d). Nu se realizează selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL sau a populației TIL recoltate pe baza expresiei CD8 în nici una dintre etapele (a) - (h). Regimul de limfodepleție non-mieloablative se administrează înaintea administrării populației TIL recoltate. Regimul de limfodepleție non-mieloablative cuprinde etapele de administrare a ciclofosfamidei la o doză de 60 mg/m²/zi timp de două zile, urmată de administrarea fludarabinei la o doză de 25 mg/m²/zi timp de cinci zile.

Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule mononucleare din sângele periferic (PBMC). PBMC pot fi iradiate și alogenice. PBMC pot fi adăugate în cultura celulară în oricare dintre zilele 9 - 14 în etapa (c).

Celulele de prezentare a antigenului pot fi celule de prezentare a antigenului artificiale.

Recoltarea din etapa (d) se poate efectua folosind un sistem de procesare celulară LOVO.

Metoda poate cuprinde recoltarea în etapa (d) prin intermediul unui sistem de procesare celulară LOVO, cum ar fi sistemul LOVO fabricat de Fresenius Kabi. Termenul "sistem de procesare celulară LOVO" se referă de asemenea la orice instrument sau dispozitiv fabricat de orice furnizor, care poate pompa o soluție conținând celule printr-o membrană sau un filtru, cum ar fi o membrană sau filtru de centrifugare într-un mediu de sistem steril și/sau închis, permițând fluxul continuu și procesarea celulară pentru a îndepărta supernatantul sau mediul de cultură celulară fără peletizare. În unele cazuri, sistemul de procesare celulară poate efectua separarea celulelor, spălare, schimb de fluid, concentrare și/sau alte etape de procesare celulară într-un sistem steril, închis.

Fragmentele tumorale pot fi fragmente multiple și cuprind circa 4 până la circa 50 fragmente, unde fiecare fragment are un volum de circa 27 mm³. Fragmentele multiple pot cuprinde circa 30 până la circa 60 fragmente cu un volum total de circa 1300 mm³ până la circa 1500 mm³. În unele aplicări, fragmentele multiple pot cuprinde circa 50 fragmente cu un volum total de circa 1350 mm³. Fragmentele multiple pot cuprinde circa 50 fragmente cu o masă totală de circa 1 gram până la circa 1.5 grame.

Fragmentele multiple pot cuprinde circa 4 fragmente. Cele 4 fragmente pot fi introduse într-un G-REX-100. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 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 sau 1 cm. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 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 sau 1 cm și se introduc într-un G-REX-100. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 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 sau 1 cm și se introduc într-un recipient având volum echivalent cu un G-REX-100. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 0.5 cm și se pot introduce într-un G-REX-100. Cele 4 fragmente pot avea diametru de circa 0.5 cm și se pot introduce într-un recipient având volum echivalent cu un G-REX-100.

Mediul de cultură celulară poate fi prevăzut într-un recipient selectat din grupul constând dintr-un recipient G și o pungă celulară Xuri.

Punga de perfuzie în etapa (e) poate fi o pungă de perfuzie conținând HypoThermosol.

Prima perioadă în etapa (b) și a doua perioadă în etapa (c) se pot efectua fiecare individual într-o perioadă de 10 zile, 11 zile sau 12 zile. Prima perioadă în etapa (b) și a doua perioadă în etapa (c) se pot efectua fiecare individual într-o perioadă de 11 zile. Etapele (a) până la (e) se pot efectua într-o perioadă de circa 25 zile până la circa 30 zile. Etapele (a) până la (e) se pot efectua într-o perioadă de circa 20 zile până la circa 25 zile. Etapele (a) până la (e) se pot efectua într-o perioadă de circa 20 zile până la circa 22 zile. Etapele (a) până la (e) se pot efectua în 22 zile sau mai puțin. Etapele (a) până la (e) și crioconservarea se pot efectua în 22 zile sau mai puțin.

Etapele (b) până la (e) se pot efectua într-un singur recipient, unde efectuarea etapelor (b) până la (e) într-un singur recipient duce la o creștere a producției TIL per tumoare rezecată față de efectuarea etapelor (b) până la (e) în mai multe recipiente.

Celulele de prezentare a antigenului se pot adăuga în TIL în a doua perioadă în etapa (c) fără deschiderea sistemului.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute în populația terapeutică de TIL pot prezenta una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute în populația terapeutică de TIL pot prezenta expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

Riscul de contaminare microbiană poate fi redus față de un sistem deschis.

TIL de la etapa (e) pot fi administrate prin perfuzie unui pacient.

Recipientul închis poate cuprinde un singur bioreactor. Recipientul închis poate cuprinde un G-REX-10. Recipientul închis poate cuprinde un G-REX-100.

EXEMPLE

Aplicările incluse în prezenta se descriu acum în legătură cu următoarele exemple. Aceste exemple se prezintă în scop exclusiv ilustrativ și invenția nu se va interpreta în nici un fel ca fiind limitată la aceste exemple, ci se va înțelege ca incluzând toate variațiile evidente ca urmare a specificațiilor prevăzute în prezenta.

EXEMPLUL 1: TESTE ÎN SISTEM ÎNCHIS

Așa cum se discută în prezenta, s-au dezvoltat protocoale și teste de generare TIL din tumori de la pacienți într-un sistem închis.

Acest exemplu descrie o nouă procedură abreviată pentru generarea numerelor clinic relevante de TIL din țesut de tumoare rezecată de la pacienți în dispozitive G-REX și crioconservarea produsului celular final. Alte aspecte ale acestei proceduri sunt descrise în Exemplele 2 - 8.

Definiții/abrevieri

BSC - Cabinet de biosecuritate

°C - grade Celsius

CO₂ - Dioxid de carbon

CD3 - Grup de diferențiere 3

CM1 - Mediu complet 1

CM2 - Mediu complet 2

TIWB - Soluție tampon de spălare și izolare a tumorii

CM4 - Mediu complet 4

CRF - Congelator cu control al ratei de îngheț

EtOH - etanol

GMP - Bună practică de producție

IL-2, rIL-2 -Interleukina-2, interleukina-2 umană recombinantă,

IU - Unitate internațională

L - Litru

LN2 - azot lichid
 mL - mililitru
 µl - microlitru
 mM - milimolar
 µm - micrometru
 NA - Inaplicabil
 PBMC - Celulă mononucleară din sânge periferic
 PPE - Echipament personal de protecție
 Pre-REP - Culturi TIL inițiale provenite din fragmente tumorale
 REP - Protocol de expansiune rapidă
 TIL - Limfocite infiltrante în tumori
 TIWB - Soluție tampon de spălare și izolare TIL
 SOP - Procedură operațională standard

15 Procedură

1. Preparare în avans: ziua 0 (Efectuată cu până la 36 de ore în avans)

1.1 Se prepară soluția tampon de spălare și izolare TIL (TIWB) prin suplimentarea 500 mL soluție salină echilibrată Hanks cu 50 µg/mL Gentamicină. Pentru soluție de bază 10 mg/mL Gentamicină se transferă 2.5 mL în HBSS. Pentru soluție de bază 50 mg/mL se transferă 0.5 mL în HBSS.

1.2. Se prepară mediu CM1 cu GlutaMax™ conform LAB-005 "Prepararea mediului pentru PreREP și REP", instrucțiuni CM2". Se depozitează la 4°C până la 24 ore. Se lasă să se încălzească la 37°C cel puțin 1 oră înaintea utilizării.

1.3. Se îndepărtează părți alicote de IL-2 din congelator la -20°C și se introduc în frigider la 2-8°C.

2. Recepția țesutului tumoral

2.1. Se păstrează toate documentele primite cu țesutul tumoral și se obțin fotografiile ale recipientului de transport și țesutului tumoral.

2.2. Dacă s-a furnizat TempTale, se imprimă și se salvează documentul asociat; se salvează PDF.

2.3. Se îndepărtează specimenul tumoral și recipientul secundar (pungi de depozitare) de la transportator și se depozitează la 4°C până la procesare.

2.4 Se expediază țesutul nefolosit în HypoThermasol sau sub formă de fragmente congelate în CryoStor CS10 (ambele disponibile în comerț de la BioLife Solutions, Inc.).

3. Procesare tumoare pentru TIL

3.1. Se transferă aseptice următoarele materiale la BSC, după caz, și se etichetează conform tabelului 3 de mai jos.

TABEL 3. Materiale pentru izolarea tumorii.

Obiect	Cantitate minimă	Etichetă proces
Tumoare	1	N/A
Vas Petri, 150 mm	1	Disecție
Vas Petri, 100 mm	4	Spălare 1, 2, 3, 4
Vas Petri, 100 mm	1	Țesut nefavorabil
Placă cu 6 godeuri	2	Etichetă capac - "Fragmente tumorale" Fund placă - "Țesut favorabil"
Riglă	2	N/A
Tampon spălare	1	N/A
Forceps	1	N/A
Forceps lung	1	N/A
Bisturiu	După necesitate	N/A

3.2. Se marchează cercurile vaselor de fragmente tumorale cu literele A-J.

3.3. Se marchează părțile inferioare ale godeurilor vaselor de țesut favorabil cu literele A - J.

3.4. Se transferă 5 mL Gentamicină în flaconul HBSS. Se marchează ca TIWB.

- 3.5. Se amestecă.
- 3.6. Se introduc cu pipeta 50 mL TIWB în fiecare din următoarele:
1. Vas spălare 1
 2. Vas spălare 2
 - 5 3. Vas spălare 3
 4. Vas spălare 4
- 3.7. Se introduc cu pipeta 2 mL TIWB în godeurile A-J ale vasului cu țesut favorabil.
- 3.8. Se acoperă vasele cu țesut favorabile (fundul plăcii cu 6 godeuri) cu vasul de fragmente tumorale (capacul plăcii cu 6 godeuri).
- 10 3.9. Folosind forcepsul lung, se îndepărtează tumoarea(ile) din flaconul de specimen și se transferă în vasul de spălare 1.
- 3.10. Se incubează tumoarea la temperatura ambiantă în vasul de spălare 1 3 minute.
- 3.11. În timpul incubării, se reetichetează flaconul de specimen "Bioburden" și se depozitează la 2-8°C până la testarea de control al calității.
- 15 3.12. Se aruncă forcepsul lung și se utilizează forcepsul scurt pentru alte manipulări.
- 3.13. Folosind forcepsul, se transferă tumoarea în vasul de spălare 2.
- 3.14. Se incubează tumoarea la temperatura ambiantă în vasul de spălare 2 3 minute.
- 3.15. Folosind forcepsul, se transferă tumoarea în vasul de spălare 3.
- 3.16. Se incubează tumoarea la temperatura ambiantă în vasul de spălare 3 timp de 3 minute.
- 20 3.17. Se îndepărtează vasele de fragment tumoral (capacele plăcii cu 6 godeuri) de pe vasele cu țesut favorabil (fundurile plăcii cu 6 godeuri) și se așază vasele de fragmente tumorale cu susul în jos pe suprafața BSC.
- 3.18. Folosind o pipetă de transfer, se adaugă aproximativ 4 picături individuale, echidistante, de TIWB în fiecare cerc al vaselor de fragmente tumorale.
- 25 3.19. Se amplasează o riglă sub vasul de disecție.
- 3.20. Folosind forcepsul, se transferă tumoarea în vasul de disecție.
- 3.21. Folosind rigla sub vasul de disecție, se măsoară și se înregistrează lungimea tumorii.
- 3.22. Pentru tumori mai mari de 1 cm, s-au pregătit alte vase cu țesut favorabil.
- 3.23. Se efectuează o disecție inițială a bucăților de tumoare în vasul de disecție în 10 bucăți intermediare, având grijă să se conserve structura tumorală a fiecărei bucăți intermediare.
- 30 3.24. Se transferă toate bucățile tumorale intermediare care nu au fost disecate activ în fragmente în vasul de spălare 4 pentru a asigura că țesutul rămâne hidratat pe durata întregii proceduri de disecție.
- 3.25. Lucrând cu o singură bucată tumorală intermediară o dată, se taie cu grijă tumoarea în fragmente de până la 3x3x3 mm în vasul de disecție, folosind rigla de sub vas ca referință. Când bisturiul se tocește, se înlocuiește cu un bisturiu nou.
- 35 3.26. Se continuă disecția fragmentelor din bucata tumorală intermediară până la evaluarea întregului țesut din bucata intermediară.
- 3.27. Se selectează fragmente favorabile și, folosind o pipetă de transfer, se transferă până la 4 fragmente favorabile în picăturile TIWB într-un cerc din vasul de fragmente tumorale.
- 40 3.28. Folosind o pipetă de transfer, se transferă toate fragmentele favorabile rămase din bucata de tumoare, dacă există, în godeul corespunzător al vasului cu țesut favorabil.
- 3.29. Folosind o pipetă de transfer, se transferă cât mai mult posibil din țesutul nefavorabil și produsul rezidual în vasul de țesut nefavorabil pentru eliberarea vasului de disecție. Țesutul nefavorabil este indicat de țesut adipos galben sau țesut necrotic.
- 45 3.30. Se continuă procesarea repetând etapa 7.3.25-7.3.30 pentru restul bucăților tumorale intermediare, lucrând cu o singură bucată intermediară o dată până la procesarea întregii tumori.
- 3.31. Dacă sunt disponibile mai puțin de 4 fragmente tumorale în cercul corespunzător al vasului de fragmente tumorale, a fost acceptabilă folosirea fragmentelor disponibile dintr-un godeu necorespunzător al vasului cu țesut favorabil pentru a atinge obiectivul de 40 de fragmente. Dacă sunt mai puțin de 40 de fragmente, 10-40 s-au așezat într-un singur balon G-Rex 100M.
- 50 4. Însămânțarea balonului G-Rex 100M
- 4.1. Se transferă aseptice următoarele materiale la BSC, după caz, și se etichetează conform tabelului 4 de mai jos.

55 **TABEL 4.** Alte materiale pentru însămânțarea baloanelor.

Obiect	Cantitate minimă	Etichetă proces
Balon G-Rex 100M	După necesitate	Lot#

Obiect	Cantitate minimă	Etichetă proces
CM 1 cald	După necesitate	Lot#
Părți alicote de IL-2	După necesitate	Lot#

- 4.2. Se suplimentează fiecare litru de CM1 cu 1 mL de soluție de bază IL-2 (6×10^6 IU/mL).
- 4.3. Se introduc 1000 mL de CM1 preîncălzit conținând 6.000 IU/mL de IL-2 în fiecare bioreactor G-REX 100M necesar determinat de tabelul 5 de mai jos.
- 5 4.4. Folosind o pipetă de transfer, se transferă numărul corespunzător de fragmente tumorale în fiecare balon G-Rex 100M, distribuind fragmentele conform tabelului 5.
- 4.5. Când se transferă unul sau mai multe fragmente tumorale în balonul G-Rex 100M, se obține un fragment tumoral suplimentar, dacă este disponibil, din vasul cu țesut favorabil și se transferă în balonul G-Rex 100M.
- 10 4.6. Se înregistrează numărul total de fragmente adăugate în fiecare balon.
- 4.7. Se aruncă vasul de țesut nefavorabil.
- 4.8. Se introduce fiecare bioreactor G-REX 100M în incubator la 37°C, 5 % CO₂.
- 4.9. Când sunt disponibile mai mult de 40 de fragmente:
- 4.9.1. Când se obțin >41 fragmente, se introduc 1000 mL de CM1 complet preîncălzit într-un al doilea
- 15 bioreactor G-REX 100M.

TABEL 5. Numărul bioreactoarelor necesare.

Număr de fragmente	G-REX	Număr de G-REX	CM1 necesar
1-40	G-REX 100M	1	1000 mL
41-80 distribuite între baloane	G-REX 100M	2	2000 mL
>80	Se congelează fragmente în CS10 după 15 minute preincubare		

5. Preparare în avans: ziua 11 (preparare până la 24 ore în avans)
- 20 5.1. Se prepară 6 L de CM2 cu GlutaMax. Se utilizează proceduri de laborator de referință pentru "Prepararea mediului pentru PreREP și REP", instrucțiuni CM2". Se încălzește la at 37°C 1 oră înaintea utilizării.
- 5.2. Părți alicote IL-2 decongelate: Se îndepărtează părți alicote IL-2 din congelator și se așază la 4°C.
6. Recoltare TIL (ziua 11)
- 25 6.1. Se îndepărtează cu grijă baloanele G-REX -100M din incubator și se așază în BSC2 atent pentru a nu perturba celulele de pe fundul balonului.
- 6.2. Folosind GatherRex sau pompă peristaltică, se aspiră ~900 mL de supernatant de cultură celulară din balon(oane).
- 6.3. Se resuspendă TIL prin agitarea ușoară a balonului. Se observă că toare celulele s-au eliberat din
- 30 membrană.
- 6.4. Folosind pompa peristaltică sau GatherRex, se transferă suspensia celulară reziduală într-un pachet de transfer sanguin dimensionat corespunzător (300-1000mL) atent pentru a nu permite transferul fragmentelor în pachetul de transfer sanguin.
- 6.5. Se adaugă la pachetul de transfer un set de transfer plasmatic 4" (se asigură că pensa este închisă).
- 35 6.6. Se masează pachetul pentru a asigura că suspensia celulară este bine amestecată și, folosind o seringă de 3 mL, se îndepărtează 1 mL de suspensie TIL pentru numărarea celulelor. Se închide tubul și se reastupă conectorul luer cu un capac luer steril nou.
- 6.7. Se introduce pachetul de transfer într-un recipient de depozitare din plastic și se reintroduce în incubator până când este gata de utilizare.
- 40 7. Prepararea mediului
- 7.1. Se lasă mediul să se încălzească la 37°C > 1h.
- 7.2. Se adaugă 3 mL de 6×10^6 IU/mL soluție de bază rhIL-2 în 6 L CM2 pentru a atinge o concentrație finală de 3.000 IU/mL rhIL-2. Se etichetează "CM2 complet".
- 7.3. Se îmbină steril un set de transfer plasmatic 4" cu conector luer cu un pachet de transfer de 1L.

- 7.4. Se transferă 500mL CM2 complet într-un pachet de transfer de 1L. se desprinde setul sau seringă de transfer al fluidului și se atașează un dop luer steril pe orificiul luer.
- 7.5. Se conectează pachetul cu un element de cuplare pentru prelevare.
- 7.6. Folosind o seringă de 1.0mL cu ac, se extrage 150 μ L de 1 mg/mL anti-CD3 (clona OKT3) și se transferă în 500 mL "CM2 complet" prin elementul de cuplare pentru prelevare. Se extrage înapoi în seringă pentru a asigura spălarea întregului reactiv din linie. Se depozitează la 37°C până la utilizare.
- 5 8. Pregătirea balonului
- 8.1. Se transferă 4.5L "CM2 complet" într-un balon G-REX-500M folosind gradațiile de pe balon ca referință.
- 10 8.2. Se introduce balonul în incubator la 37°C până când este gata.
9. Decongelarea celulelor feeder iradiate
- 9.1. Se utilizează 5.0×10^9 celule feeder alogenice iradiate de la doi sau mai mulți donatori.
- 9.2. Se îndepărtează celulele feeder din congelator LN₂ și se introduc într-o pungă de transport de pericol biologic.
- 15 9.3. Cu celulele feeder în punga de transport de pericol biologic, se decongelează celulele în incubator sau baie la 37°C. Se păstrează pungile statice și scufundate. Se îndepărtează celulele din baie când sunt aproape complet decongelate, dar încă reci.
- 9.4. Se pulverizează pungile de celule feeder cu 70% EtOH și se așază în BSC2. Se adaugă fiecare pungă feeder direct în G-Rex 500M deschis pentru a asigura un număr suficient de celule iradiate (5×10^9 celule, +/- 20%).
- 20 9.5. Se închid ambele pense pe un conector tip Y fenwal cu sistem de conectare luer lock.
- 9.6. Se conectează fiecare pungă feeder cu un picior al conectorului Y.
- 9.7. Se îndepărtează pachetul de transfer de 1L cu 500 mL "CM2 complet" + OKT3 și se transferă în BSC.
- 9.8. Se atașează aseptice o seringă de 60mL de un robinet de închidere cu 3 căi și se atașează aseptice pachetul de transfer la capătul exterior al robinetului de închidere.
- 25 9.9. Se atașează aseptice conectorul Y de robinetul de închidere cu 3 căi.
- 9.10. Se extrage întregul conținut al pungilor feeder în seringă, se înregistrează volumul și se distribuie 5.0×10^9 celule feeder alogenice iradiate în pachetul de transfer.
- 9.11. Se prinde, se detașează pachetul de transfer de aparat și se astupă conectorul luer interior cu un dop luer steril nou.
- 30 9.12. Folosind un ac și o seringă de 3 mL, se extrage 1 mL pentru numărarea celulelor din elementul de cuplare pentru prelevare.
- 9.13. Când se atinge +/- 10% din numărul celulelor țintă (5.0×10^9) cu viabilitate >70%, se continuă.
- 9.14. Când se atinge sub 90% din numărul celulelor țintă (5.0×10^9) cu viabilitate >70%, se decongelează o altă pungă și se repetă 7.9.4-7.9.12. Când se atinge mai mult de 110% din numărul celulelor țintă, se calculează volumul corespunzător necesar pentru doza celulară dorită și se continuă.
- 35 10. Co-cultura TIL și feeder în balonul G-REX 500M
- 10.1. Se îndepărtează balonul G-REX 500M conținând mediul preparat din incubator și se introduce în BSC2.
- 40 10.2. Se atașează pachetul de transfer feeder la G-REX -500M și se lasă conținutul pungii să curgă în 500M.
- 10.3. Se îndepărtează suspensia TIL din incubator și se introduce în BSC.
- 10.4. Se calculează volumul suspensiei TIL de adăugat pentru a obține 200×10^6 celule viabile totale.
- $(TVC/mL) / 200 \times 10^6 = mL$
- 45 10.5. Când TIL au fost între $5-200 \times 10^6$ celule viabile totale, se adaugă toate TIL (volum total) în G-REX-500M. Când numărul TIL a fost mai mare de 200×10^6 celule viabile totale, se adaugă volumul calculat necesar pentru 200×10^6 TIL de distribuit într-un G-REX -500M individual. Restul TIL s-au centrifugat și s-au congelat în cel puțin două criofiole până la $10^8/mL$ în CS10, s-au etichetat cu identificarea TIL și data congelării.
- 10.6. Se introduce G-REX -500M într-un incubator la 37°C, 5% CO₂ timp de 5 zile.
- 50 11. Preparare în avans: ziua 16-18
- 11.1. Se încălzește 1 pungă de 10L de AIM V pentru culturi inițiate cu mai puțin de 50×10^6 TIL încălzite 2 pentru cele inițiate cu peste 50×10^6 TIL la 37°C cel puțin 1 h sau până când sunt gata de utilizare.
12. Efectuarea numărului de celule TIL: ziua 16-18
- 12.1. Se îndepărtează balonul G-REX -500M din incubator și se introduce în BSC2 atent pentru a nu perturbă cultura celulară de pe fundul balonului.
- 55 12.2. Se îndepărtează aseptice 4 L de mediu de cultură celulară din balonul G-REX -500M și se introduce într-un recipient steril.
- 12.3. Se agită G-REX -500M până când toate TIL s-au resuspendat din membrană.

- 12.4. Folosind GatherRex sau pompa peristaltică se transferă suspensia celulară într-un pachet de transfer de 2L. Balonul 500M se reține pentru utilizare viitoare. Se închide orificiul cu elementul de cuplare pentru prelevare pentru a evita pierderea TIL.
- 12.5. Se conectează pachetul de transfer cu un element de cuplare pentru prelevare și, folosind o seringă de 3mL și un ac, se îndepărtează 2×1 mL probe independente pentru numărarea celulelor.
- 12.6. Se calculează numărul total number al baloanelor necesare pentru subcultură conform următoarei formule. Frațiile se rotunjesc în sus.
Celule viabile totale $11.0 \times 10^9 = \text{balon \#}$
13. Se prepară CM4
- 13.1. Se prepară o pungă de 10L de AIM-V pentru fiecare două 500M baloane necesare. Se încălzește mediu suplimentar dacă este necesar.
- 13.2. Pentru fiecare 10 L de AIM-V necesar, se adaugă 100 mL de GlutaMAX pentru prepararea CM4.
- 13.3. Se suplimentează mediul CM4 cu rhIL-2 pentru o concentrație finală de 3.000 IU/mL rhIL-2.
14. Separarea culturii celulare
- 14.1. Folosind gradațiile de pe balon, se umple gravitațional fiecare G-REX -500M la 5 L.
- 14.2. Se distribuie uniform volumul TIL în numărul calculat de G-REX -500M.
- 14.3. Se introduc baloanele într-un incubator la 37°C, 5% CO2 până la recoltare în ziua 22 a REP.
15. Preparare în avans: ziua 22-24
- 15.1. Se prepară 2L de 1% tampon spălare HSA adăugând 40mL de 25% HSA în fiecare din două pungi de 1L de PlasmaLyte A 7.4. Se colectează într-o pungă auxiliară LOVO.
- 15.2. Se suplimentează 200 mL CS10 cu IL-2 @ 600 IU/mL.
- 15.3. Se pre-răcesc patru recipiente de congelator de 750 mL din aluminiu la 4°C.
16. Recoltare TIL: ziua 22-24
- 16.1. Se îndepărtează baloanele G-REX -500M din incubator la 37°C și se introduc în BSC2 atent pentru a nu perturba cultura celulară de pe fundul balonului.
- 16.2. Se aspiră și se îndepărtează 4.5 L din supernatantul de cultură celulară din fiecare balon.
- 16.3. Se agită balonul G-REX -500M pentru a resuspenda complet TIL.
- 16.4. Se cântărește punga de 3-5L înaintea utilizării.
- 16.5. Folosind GatherRex sau pompa peristaltică, se recoltează TIL în punga de bioprocesare.
- 16.6. Se amestecă bine punga și, folosind o seringă de 3mL, se extrag probe 2×2 mL din orificiul de prelevare pentru numărarea celulelor.
- 16.7. Se cântărește punga și se determină diferența între greutatea inițială și finală. Se folosește următorul calcul pentru a determina volumul suspensiei celulare.
Greutate netă a suspensiei celulare (mL) $11.03 = \text{volum (mL)}$
17. Filtrarea TIL și prepararea pungii sursă LOVO
- 17.1. Se introduce punga conținând cultura celulară în BSC2.
- 17.2. Se introduce un filtru sanguin de 170 μm în BSC2 și se închid toate pensele.
- 17.3. Se îmbină steril un suport sursă al filtrului cu suspensia celulară.
- 17.4. Se cântărește o nouă pungă de bioprocesare dimensionată corespunzător (denumită pungă sursă LOVO).
- 17.5. Se îmbină steril capătul terminal al filtrului cu punga sursă LOVO.
- 17.6. Se ridică suspensia celulară prin suspendarea celulelor pe un suport IV pentru a asigura un transfer gravitațional al celulelor.
 Notă: (nu se lasă punga sursă să atârne de aparatul de filtrare.)
- 17.7. Se deschid toate pensele necesare și se lasă TIL să se scurgă din punga de suspensie celulară prin filtru în punga sursă LOVO.
- 17.8. După ce se transferă toate celulele în punga sursă LOVO, se închid toate pensele și se închide ermetic tubul pungii sursă LOVO pentru îndepărtarea filtrului.
- 17.9. Se cântărește punga sursă LOVO și se calculează volumul.
- 17.10. Punga sursă LOVO este pregătită pentru LOVO.
- 17.11. Se îndepărtează punga cu produs final LOVO din kit prin etanșarea tubului lângă pungă.
18. Se prepară TIL 1:1 în CS10 rece suplimentat cu 600 IU/mL rhIL-2
- 18.1. Se calculează numărul necesar de criorecipientele necesare.
(volumul produsului celular x 2)/100 = numărul pungilor necesare (rotunjire în jos)
- 18.2. Se calculează volumul de distribuit în fiecare pungă.
(volumul produsului celular x 2) / numărul pungilor necesare = volum de adăugat în fiecare pungă
- 18.3. Se transferă aseptice următoarele materiale din tabelul 6 în BSC.

TABEL 6. Materiale pentru crioconservare TIL.

Obiect	Cantitate minimă	Etichetă proces
Produs celular	1	Lot#
Casetă congelator din aluminiu (750 ml)	1	n/a
CS10 rece + IL-2 @600IU/mL	După necesitate	Lot#
Dispozitiv de conectare celulară CC1	1	n/a
Criorecipiente de 750 mL	calculated	Label părți alicote 1-largest#
Seringă de 100 mL	#criorecipiente +1	n/a
Robinet de închidere cu 3 căi	1	n/a
Criofiole	5	TIL Cryo-product satellite vials

19. Compoziție TIL

19.1. Se închid toate pensele pe Cell Connect CC1.

5 19.2. La dispozitivul de conectare celulară se atașează aseptice produsul final LOVO, sistemul de conectare luer lock al pungii CS10 și numărul corespunzător de criorecipiente. Se înlocuiește seringă de 60 mL cu o seringă de 100 mL.

19.3. Cantitatea volumului CS10 necesar a fost echivalent cu volumul pungii de produs final LOVO.

10 19.4. Se deschide calea robinetului de închidere și se deschide linia dintre punge de produs final LOVO și seringă pentru extragerea CS10 în seringă, se reînchide calea CS10. Se deschide calea la punge celulară pentru a introduce CS10 în punge de produs final LOVO. Se folosește seringă pentru a măsura volumul adăugat în punge de produs final LOVO. Se repetă după necesitate folosind o seringă nouă până când se transferă cantitatea dorită de CS10.

19.5. Se amestecă punge de produs final LOVO prin răsturnare.

15 19.6. Se înlocuiește seringă de 100 mL

19.7. Se deschid pensele pe câte un criorecipient de 750 mL

19.8. Se deschid numai pensele direct asociate cu produsul preparat și criorecipientul în uz.

19.9. Se utilizează seringă de 100 mL pentru a măsura volumul de produs preparat către criorecipient.

19.10. Se transferă 100 mL de produs preparat în fiecare criorecipient.

20 19.11. După adăugare în fiecare punge, se extrage din nou în seringă pentru îndepărtarea tuturor bulelor de aer din criorecipient și se reînchide linia asociată.

19.12. Din punge finală se extrag 10 mL pentru testare QC.

19.13. Se închide ermetic fiecare criorecipient, lăsând un tub cât mai mic posibil.

25 19.14. Se îndepărtează seringă conținând proba reținută și se transferă într-un tub conic de 50mL; se transferă 1.5ml în criofiole individuale și se congelează într-un congelator cu rată controlată de îngheț.

19.15. Se transferă pungile etanșate la 4°C în timp ce se pregătesc etichetele.

19.16. Se etichetează fiecare criorecipient cu descrierea produsului, numele și data, volumul, numărul de celule și viabilitatea.

19.17. Se introduce fiecare criorecipient în casete de aluminiu pre-răcite de congelator.

30 20. Crioconservarea TIL folosind congelator cu control al ratei de îngheț (CRF)

20.1. Se urmează procedura standard pentru congelatorul cu rată controlată de îngheț.

20.2. După folosirea CRF, se depozitează criorecipientele în azot lichid (LN₂).

21. Se determină rezultatele estimate și se măsoară criteriile de acceptare.

35 **EXEMPLUL 2: DESFĂȘURAREA PROCESULUI PE 8 TUMORI DE LA PACIENȚI**

Procesul din Exemplul 1 s-a desfășurat folosind 8 tumori de la pacienți pentru a produce 8 loturi de TIL. S-au obținut o bună recuperare din cultură, viabilitate, număr de celule, CD3⁺ (indicând conținutul % de celule T) și eliberare IFN-gamma (IFN-g sau IFN-γ) bune, așa cum se indică în Tabelul 7 de mai jos și în Figura 7 până la Figura 10.

40

45

TABEL 7. Rezultatele testului de identitate, potențial și viabilitate/recuperarea procesului din Exemplul 1.

	IFNg (pg/1e6 celule/24r)	CD3 (%)	Celule/mL (Viabile+neviabile)	% recuperare	% viabilitate
				Proaspete/Lovo	
M1061T	4570	95.3	1.27E+08	103	88.1
M1062T	3921	99.7	1.65E+08	89	84.5
M1063T	5587	98.7	1.51E+08	112	82.1
M1064T	619	84.5	1.75E+08	83	86.8
M1065T	1363	96.8	3.42E+07	128	76.4
EP11001T	4263	90.4	1.82E+08	92	77.9
M1056T	6065	94.2	2.11E+08	85	84.8
M1058T	1007	99	2.72E+08	89	87.5

EXEMPLUL 3: SCALABILITATEA PROCESULUI TIL MODIFICAT

5 Studiile prezentate aici s-au efectuat într-un laborator de dezvoltare a procesului (PD) și apoi s-a efectuat un studiu de calificare a procesului (PQ) utilizând probe tehnice într-o cameră cu atmosferă controlată GMP dintr-o unitate de producție. S-au realizat trei probe PQ/tehnice în camera cu atmosferă controlată GMP conform unui protocol de calificare și a unei evidențe a loturilor pe baza studiilor PD prezentate aici. Criteriile de acceptare pentru probele tehnice au fost stabilite prospectiv. Studiul PQ este prezentat pe scurt mai jos și rezultatele obținute pentru

10 loturile tehnice sunt indicate în secțiunile următoare.

Numărul celulelor generate din culturile pre-protocol de expansiune rapidă (pre-REP) au depășit adesea 100×10^6 celule viabile. În plus, includerea unui ciclu de îngheț-dezghet între erapele de cultură pre-REP și REP a redus producția de celule viabile. Eliminând etapa de crioconservare din proces, REP poate fi inițiat fiabil și regulat cu un număr crescut de TIL. Această modificare a permis scăderea duratei REP cu un nivel proporțional al perioadelor de dublare a celulelor la aproximativ 11 zile fără a afecta doza celulară. În plus, perioada de cultură redusă de la activare la recoltare duce la un produs mai puțin diferențiat și posibil mai capabil să persiste *in-vivo* (Tran 2008).

15 Studiul PD a validat inițierea culturii REP cu până la 200×10^6 celule cu un număr fix de celule feeder. Timpul optim până la recoltarea culturii REP s-a evaluat în 9 până la 14 zile. Culturile au fost înșămânțate la raporturi între feeder și TIL cuprinse între 100:1 și 25:1. Optimizarea timpului de recoltare s-a determinat măsurând numărul total al celulelor, viabilitatea, imunofenotipul, consumul de mediu, analiza metaboliților, analiza interleukinei-2 (IL-2) și analizele funcționale descrise mai jos.

20 Imunofenotiparea celulelor la sfârșitul culturii REP s-a evaluat pe baza markerilor indicați în Tabelul 8 de mai jos. S-au evaluat activarea fenotipică și starea de diferențiere a celulelor. Nu s-au observat diferențe statistice ale fenotipului în nici una din condițiile experimentale.

TABEL 8. Markerii de activare și diferențiere testați pe culturi de optimizare a procesului.

Țintă	Marcator pentru detecție	Clonă
Grup 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
Grup 2		

Țintă	Marcator pentru detecție	Clonă
Grup 1		
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
Grup 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
Abrevieri: PE/Cy7=ficoeritrină: Cy-7 conjugat tandem; PerCP-Cy5.5=complex de proteină-peridimină-clorofilă:CY5.5 conjugat; PE=ficoeritrină; FITC=conjugat izotiocianat fluoresceina; APC-H7=aloficocianina:H7 conjugat tandem; APC=aloficocianina; PB=Pacific Blue™		

Consumul de mediu și producția metaboliților au rămas în limitele tolerabile pentru toate condițiile testate; și nivelurile IL-2 au rămas mai mari de 150 IU/mL de supernatant de cultură (date nereprezentate).

5 Distrugerea celulelor tumorale de către celule T se înțelege ca fiind mediată de activarea receptorului T celular pe celule T efectoare în răspuns la peptide prezentate pe suprafața celulelor tumorale. Celulele T amplificate *ex vivo* trebuie să rețină capacitatea de activare și proliferare în răspuns la activarea TCR dacă persistă *in vivo* la perfuzie și mediază regresia tumorii.

10 Pentru a evalua potențialul de activare al celulelor cultivate, TIL recoltate la intervale diferite au fost reactivitate cu PBMC alogene iradiate încărcate cu OKT3. Culturile TIL au fost recoltate după 7 zile și s-a evaluat cu privire la gradul de amplificare. Rezultatele acestui studiu sunt prezentate pe scurt în Tabelul 9.

15 **TABEL 9.** Rezumatul rezultatelor: proliferarea TIL post-REP la re-cultivare cu PBMC alogene încărcate cu OKT3.

Ziua recoltării	Nr. de ori expansiune	SD	Valoare-p (test 't' Student)
Experiment 1			
Ziua 9	43	6.088	NA
Ziua 10	48	3.105	NA
Ziua 11	71	11.137	0.135
Ziua 14	60	6.995	
Experiment 2			
Ziua 9	44	6.276	NA
Ziua 10	27	4.762	NA

Ziua recoltării	Nr. de ori expansiune	SD	Valoare-p (test 't' Student)
Experiment 1			
Ziua 11	72	18.795	0.045
Ziua 14	41	7.050	
Experiment 3			
Ziua 9	54	5.810	NA
Ziua 10	54	9.468	NA
Ziua 11	65	1.674	0.071
Ziua 14	50	8.541	

Acest studiu a demonstrat că potențialul pentru TIL activate în acest test a crescut cu fiecare zi de cultură până în ziua 11 (zile de recoltare 9-11). Celulele recoltate în ziua 11 a procesul modificat efectuat în mod similar cu TIL de control s-au menținut în cultură 14 zile, similar cu procesul actual.

Aceste studii au demonstrat scalabilitatea procesului TIL modificat și au stabilit un interval acceptabil al raporturilor de însămânțare între TIL și celulele feeder. În plus, caracteristicile de creștere au persistat până în ziua 14 a culturii, iar condițiile de cultură au rămas optime până în ziua 11. Condițiile testate nu au indicat nici un efect măsurabil asupra fenotipului TIL. Celulele recoltate în ziua 11 a culturii REP au demonstrat cea mai bună capacitate de a răspunde la reactivare, în timp ce condițiile culturii celulare au rămas în limitele toleranțelor. Aceste modificări au fost adoptate și validate la scară completă, separarea culturii având loc în ziua 5 și recoltarea în ziua 11.

Probele tehnice au fost implementate în unitatea de dezvoltare a procesului pentru a câștiga experiență în prepararea și testarea produsului TIL înainte de fabricarea GMP a produsului TIL autolog pentru administrare la pacienți. Procedura de preparare folosită pentru probele tehnice a fost la aceeași scară precum cea utilizată în prepararea produsului GMP TIL. Experiența creșterii TIL din diferite tipuri de tumori, inclusiv metastaze, de melanom, mamare, carcinom cu celule scuamoase la cap și gât (HNSCC), carcinom de col uterin și cancer pulmonar a determinat că disecția și creșterea TIL din probe metastatice sunt similare pentru aceste cancere (Sethuraman 2016, JITC P42). Dat fiind că izolarea inițială a fragmentelor tumorale și creșterea limfocitelor par să fie similare între histologiile tumorale, aceste probe tehnice sunt suficiente pentru calificarea procesului de producere a TIL din HNSCC, tumori de col uterin și melanom.

Tabelul 10 indică sursa și caracteristicile probelor tumorale folosite pentru probele tehnice.

TABEL 10. Probe tumorale testate pentru probe tehnice.

Proba tumorală	Proba tehnică 1	Proba tehnică 2	Proba tehnică 3
ID pacient	1001185	600-D455	40231
Sursă	Biothema Research	BioOptions	Moffitt
Țesut	Plămân stâng	Sân, ERPR+Her2-	Melanom
Data procesării	5 ianuarie 2017	12 ianuarie 2017	26 ianuarie 2017

Testarea eliberării de produs a celor probe tehnice de TIL în unitatea de dezvoltare a procesului a fost realizată (Tabel 11) așa cum se descrie mai jos. Produsul a fost testat în ziua 16 și ziua 22. S-a determinat și secreția IFN- γ pentru cele trei probe tehnice (Tabel 12) detaliată în altă parte.

TABEL 11. Rezultatele testului de eliberare a produsului pentru probele tehnice la unitatea de dezvoltare a procesului.

Parametru	Metoda de testare	Criterii acceptare	Probe tehnice		
			Proba 1	Proba 2	Proba 3
Sterilitate*	BacTAlert	Fără creștere	Fără creștere	Fără creștere	Fără creștere

	Parametru	Metoda de testare	Criterii de acceptare	Probe tehnice		
				Proba 1	Proba 2	Proba 3
Ziua 16	Micoplasma	PCR	Negativ din separarea în ziua 7	Negativ	Negativ	Negativ
Ziua 22	Viabilitate (%)	AOPI	≥ 70%	82.3%	85.13%	84.6%
	Celule viabile totale	AOPI	Rezultate raportate	2.6 x 10 ¹⁰	1 x 10 ¹⁰	1.4 x 10 ¹¹
	Sterilitate	Colorație Gram	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	Sterilitate produs final *	BacT/Alert	Fără creștere	Negativ	Negativ	În așteptare
	% CD45 ⁺ CD3 ⁺	Citometrie în flux	≥ 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 produs final	PCR	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	Aspect	Inspecție vizuală	Pungă intactă fără cocoloașe	Pungă intactă, fără cocoloașe vizibile	Pungă intactă, fără cocoloașe vizibile	Pungă intactă, fără cocoloașe vizibile

*Rezultatele sterilității finale pentru ziua 16 și ziua 22 nu sunt disponibile până după eliberarea produsului final pentru expediere. Se folosesc rezultatele colorației gram din ziua 22 pentru eliberarea în vederea expedierii.

TABEL 12. Caracterizare funcțională suplimentară: măsurarea secreției IFN- γ .

Caracterizare funcțională	Metoda	Rezultate estimate	Proba tehnică		
			Proba 1	Proba 2	Proba 3
Stimulare IFN- γ cu anti-CD3, CD28, CD137 (pg/milion celule)	ELISA	>2 abateri standard față de nestimulare	3085 +/- 182	2363 +/- 437	În așteptare
IFN- γ nestimulat (pg/milion celule)	ELISA	Inaplicabil	34 +/- 5	27 +/- 10	În așteptare

5 În concluzie, datele din probele tehnice demonstrează că produsul medicamentos TIL poate fi preparat în scopul administrării autologe la pacienți.

EXEMPLUL 4: LIMFODEPLEȚIE

Numărarea celulelor se poate realiza în ziua 7 și înainte de limfodepleție. Produsul celular final a inclus până la aproximativ 150×10^9 celule viabile preparate într-un minim de 50% HypoThermosol™ în Plasma-Lyte A™ (volum/volum) și până la 0.5% HSA (compatibil pentru perfuzie umană) conținând 300 IU/mL IL2. Produsul final a fost disponibil pentru administrare într-unul din două volume pentru perfuzie:

1) 250 mL (într-o pungă de perfuzie cu capacitate de 300-mL) când TIL recoltate totale sunt $\leq 75 \times 10^9$

15 SAU

2) 500 mL (într-o pungă de perfuzie cu capacitate de 600-mL) când TIL recoltate totale sunt $< 150 \times 10^9$

Nu a putut fi preconizat numărul total al celulelor generate pentru produsul perfuzabil TIL final pentru fiecare pacient din cauza variației între pacienți a catelor de expansiune a celulelor T în timpul etapei REP. O limită inferioară a celulelor în ziua 3, 4, 5, 6, 7 ale REP de 3 până la 14 zile este stabilită pe baza

numărului minim de celule necesare pentru a lua decizia de realizare a limfodepleției pacientului folosind regimul chimioterapeutic ciclofosfamida plus fludarabina. După ce am început limfodepleția pe baza acestui număr minim atins de celule, am tratat pacientul cu numărul disponibil de TIL generate în REP în oricare dintre zilele 3 până la 14 și în multe cazuri ziua 7. Limita superioară a intervalului pentru perfuzie (150 × 10⁹ celule viabile) se bazează pe limita superioară publicată cunoscută ca fiind sigură pentru perfuzie, la care se obține un răspuns clinic. Radvanyi, et al., Clin Cancer Res 2012, 18, 6758-6770.

EXEMPLUL 5: PROCESUL 2A - ziua 0

Acest exemplu descrie protocolul detaliat din ziua 0 pentru 2A pdescriș în Exemplele 1 - 4.

Preparare.

1. Se confirmă mediul de spălare a tumorii, CM1 și IL-2 sunt în limita de valabilitate.

2. Se introduce CM1 (mediul celular 1) în incubator.

Metodă.

1. Se curăță cabinetul de biosecuritate (BSC).

2. Se organizează plăcile de monitorizare a procesului și se lasă în cabinetul de biosecuritate 1-2

ore în timpul procedurii.

3. Se introduce mediul TIL CM1 în cabinetul de biosecuritate.

4. Se prepară mediul TIL CM1 conținând 6000 IU/mL IL-2:

4.1. 1L CM1

4.2. 1ml IL-2 (6.000.000 IU/mL)

4.3. Se introduc 25ml de CM1+IL2 în tubul conic de 50ml folosit pentru fragmente la adăugare în G-REX.

4.4. Se introduc în incubator la 37°C pentru pre-încălzire

5. Se șterge pachetul G-REX 100MCS cu 70% alcool și se introduce în cabinetul de biosecuritate.

Se închid toate pensele cu excepția liniei filtrului.

6. Se calibrează pompa Acacia.

7. Se atașează linia roșie a balonului G-REX 100MCS la linia de ieșire a pompei acacia.

8. Se atașează sistemul pumpmatic la linia de admisie a pompei și se introduc în flacon cu mediul.

Se eliberează pensele la pompă.

9. Se pompează restul de 975 ml CM1 preîncălzit conținând 6.000 IU/mL IL-2 în fiecare bioreactor G-REX 100MCS.

10. Se etanșează termic linia roșie, deconectare de la pompă.

11. Se etichetează G-REX.

12. Se introduce G-REX 100MCS în incubator cât este necesar.

Disecție tisulară

1. Se înregistrează ora de începere a procesării tumorale.

2. Se transferă mediul de spălare a tumorii în BSC.

3. Se introduc 5 vase Petri de 100 mm în cabinetul de biosecuritate, 3 pentru spălări, 1 pentru menținere și 1 pentru țesut nefavorabil. Se etichetează vasele în mod corespunzător. Țesutul nefavorabil a fost indicat de țesut adipos galben sau țesut necrotic.

4. Se introduc trei plăci cu 6 godeuri în cabinetul de biosecuritate.

5. Se introduc cu pipeta 3-5 mL de mediu de spălare a tumorii în fiecare godeu al unei plăci cu șase godeuri pentru bucățile de tumori în exces.

6. Se introduc cu pipeta 50 mL de mediu de spălare a tumorii în vasele de spălare 1-3 și vasul de menținere.

7. Se introduce două vase de disecție de 150 mm în cabinetul de biosecuritate.

8. Se introduc 3 tuburi conice de 50 mL sterile în BSC.

9. Se etichetează unul ca mediu de spălare pentru forceps, al doilea ca mediu de spălare pentru bisturiu și al treilea ca mediu de spălare folosit pentru picăturile de pe capac.

10. Se adaugă 5-20 mL de mediu de spălare tumorală în fiecare tub conic. Forcepsurile și bisturiurile s-au scufundat în mediul de spălare după necesitate în timpul procesului de spălare și disecție a tumorii.

11. Se introduc bisturiul și forcepsul în tuburile corespunzătoare.

12. Folosind forcepsul lung se îndepărtează tumoarea(ile) din flaconul de specimen și se transferă în vasul de spălare 1.

13. Se incubează tumoarea la temperatura ambiantă în vasul de spălare 1 timp de ≥3 minute.

14. În timpul incubării, se re-etichetează flaconul de specimen "Bioburden" și se depozitează la 2-8°C până la recoltarea finală sau până când este necesară altă testare de sterilitate.

15. Folosind forcepsul se transferă tumoarea în vasul de spălare 2.
16. Se incubează tumoarea la temperatura ambientă în vasul de spălare 2 timp de ≥ 3 minute.
17. În timpul incubării, folosind o pipetă de transfer, se adaugă aproximativ 4 picături individuale, la distanță egală, de mediu de spălare a tumorii în fiecare cerc al capacelor plăcii cu 6 godeuri desemnate ca vase de fragmente tumorale.
18. Folosind forcepsul se transferă tumoarea în vasul de spălare 3.
19. Se incubează tumoarea la temperatura ambientă în vasul de spălare 3 timp de ≥ 3 minute.
20. Capacul vasului de 150 mm s-a folosit pentru disecție. Se introduce o riglă dedesubt.
21. Folosind forcepsul se transferă tumoarea în vasul de disecție, se măsoară și se înregistrează lungimea tumorii.
22. Se fotografiază tumoarea.
23. Se efectuează o disecție inițială a bucăților de tumoare în vasul de disecție în bucăți intermediare având grijă să se păstreze structura tumorală a fiecărei bucăți intermediare.
24. Se transferă bucățile tumorale intermediare care nu au fost disecate activ în fragmente în vasul de menținere a țesuturilor pentru a asigura că țesutul rămâne hidratat pe durata întregii proceduri de disecție.
25. Se lucrează cu o bucată tumorală intermediară o dată, se taie cu grijă tumoarea în fragmente de aproximativ $3 \times 3 \times 3$ mm în vasul de disecție, folosind rigla de sub vas ca referință
26. Se continuă disecția fragmentelor din bucata tumorală intermediară până la evaluarea întregului țesut din piesa intermediară.
27. Se selectează fragmente favorabile și, folosind o pipetă de transfer, se transferă până la 4 fragmente favorabile în picăturile de mediu de spălare într-un cerc în vasul de fragmente tumorale. Folosind o pipetă de transfer, un bisturiu sau un forceps, se transferă cât mai mult posibil din țesutul nefavorabil și produsul rezidual în vasul de țesut nefavorabil pentru a elibera vasul de disecție. Întregul țesut rămas s-a introdus într-unul din godeurile plăcii cu șase godeuri. (Țesutul nefavorabil a fost indicat de țesut adipos galben sau țesut necrotic.)
28. Se continuă procesarea repetând etapa 23- 26 pentru restul bucăților tumorale intermediare, lucrând cu o singură bucată intermediară o dată, până la procesarea întregii tumori. (Se obține un bisturiu sau un forceps nou după necesitate, conform deciziei tehnicianului de procesare.)
29. Se deplasează plăcile cu fragmente către spatele capacului.
30. Folosind pipeta de transfer, bisturiul sau forcepsul, se transferă până la 50 dintre cele mai bune fragmente tumorale în tubul conic de 50 mL etichetat de fragmente tumorale conținând CM1.
31. Se îndepărtează materialele flotante din tubul conic de 50 mL cu pipeta de transfer. Se înregistrează numărul de fragmente și materiale flotante.
32. Se îndepărtează toate elementele nenecesare de pe capac, reținând plăcile cu țesut favorabil dacă acestea conțin fragmente suplimentare. Se șterge capacul cu alcool.
33. Se îndepărtează G-REX 100MCS din incubator, se șterge cu alcool 70% și se introduce în cabinetul de biosecuritate.
34. Se agită tubul conic cu fragmente tumorale și se toarnă conținutul din tubul conic de 50ml în balonul G-Rex 100MCS.
35. Dacă se transferă unul sau mai multe fragmente tumorale în balonul G-Rex 100M, se obține un fragment tumoral suplimentar când este disponibil din vasul cu țesut favorabil și se transferă în balonul G-Rex 100M.
36. Se înregistrează numărul incubatoarului și numărul total de fragmente adăugate în fiecare balon.
37. Se introduce bioreactorul G-REX 100M în incubator la 37°C , 5% CO_2 .
38. Tumorile neutilizate s-au introdus în 100 mL de HypoThermosol și s-au livrat la laborator.
39. Se înregistrează ora de încheiere a procesării tumorii.
40. Se elimină meniul complt TIL neutilizat conținând IL-2 și părțile alicote IL-2 neutilizate.
41. Se curăță cabinetul de biosecuritate.
42. Se așază proba Bioburden în condiții de depozitare adecvate.
43. Se înregistrează data.
44. Se salvează fotografia ca fișier specimen ID#tumoare, data procesului, pentru întocmirea fișierului pacientului.
45. Se comandă și se asigură livrarea plăcilor de sedimentare în laboratorul de microbiologie.

EXEMPLUL 6: PROCESUL 2A - ziua 11

Acest exemplu descrie protocolul detaliat din ziua 11 pentru procesul 2A descris în Exemplele 1 - 4.

Preparare în avans.

1. Ziua de dinaintea procesării:

1.1. CM2 se poate prepara în ziua de dinaintea procesării. Se așază la 4°C.

2. Ziua procesării.

5 2.1. Se pregătește echipamentul de celule feeder.

2.1.1. Se închid toate pensele pe CC2 și seturile de conectori 4S-4M60.

2.1.2. Se îmbină steril 4 racorduri de echipament 4S-4M60 cu linia de adaos pe CC2 cu îndepărtarea adaosului.

2.1.3. Se lasă de-o parte pentru colectarea celulelor feeder.

10 2.2. Se prepară 5 mL de mediu de crioconservare per CTF-FORM-318 și se așază la 4°C până la utilizare.

Monitorizarea mediului camerei cu atmosferă controlată - pre-procesare

1. Se înregistrează informațiile camerei cu atmosferă controlată.

15 2. Cabinetele de biosecuritate (BSC) s-au curățat cu șervețele mari saturate cu alcool sau pulverizare cu alcool.

3. Se verifică numărul de particule cu 10 minute înainte de a începe procesarea.

4. Se organizează plăcile de monitorizare a procesului și se lasă în cabinetul de biosecuritate 1-2 ore înainte a procedurii.

20

Se pregătește balonul G-Rex 500MCS:

1. Folosind seringă de 10 mL, se transferă aseptice 0.5mL de IL-2 (soluție de bază 6×10^6 IU/mL) pentru fiecare litru de CM2 (mediu celular 2) în punga de bioprocesare printr-un conector luer steril neutilizat.

25

2. Se utilizează aerul în exces din seringă pentru curățarea liniei, se extrage mediu din pungă și se reintroduce. Se asigură astfel că întreaga IL-2 s-a amestecat cu mediul. Se amestecă bine.

3. Se deschide ambalajul exterior și se introduce G-Rex 500MCS în BSC. Se închid toate pensele pe dispozitiv cu excepția liniei filtrului.

30

4. Se îmbină steril linia de recoltare roșie de la G-Rex 500MCS la linia de ieșire a pompei.

5. Se conectează conectorul luer interior al pungii de bioprocesare cu conectorul luer exterior al pompei.

6. Se atarnă punga de bioprocesare pe suportul IV, se deschid pensele și se pompează 4.5 litri de mediu CM2 în G-Rex 500MCS. Se curăță linia, se închide și se etanșează termic.

35

7. Se reține linia de la pompă la mediu. S-a utilizat la prepararea celulelor feeder.

8. Se introduce G-Rex 500MCS în incubator.

Prepararea celulelor feeder iradiate

1. Se închide ermetic și se îndepărtează adaosul de la IL TP. Se închid ambele linii.

40

2. Se înregistrează greutatea uscată a unui pachet de transfer (de IL TP).

3. Se îmbină steril pachetul de transfer de 1L cu pompa acacia ~12" de la pungă.

4. Celălalt capăt al tubajului pompei este conectat încă la labtainer de 10L.

5. Se pompează 500mL CM2 din greutate în TP.

45

6. Se închide pensa și se închide ermetic.

7. Introducere în incubator.

8. Se verifică și se deconectează pungile de celule feeder.

9. Se înregistrează lotul feeder folosit.

10. Se șterg pungile cu alcool.

50

11. Se introduc în punge de depozitare.

12. Se decongelează celulele feeder în baie de apă la 37°C (+/- 1°C). Se înregistrează temperatura băii.

13. Se îndepărtează și usucă cu tifon.

14. Se trec celulele feeder prin deschizătură în camera de preparare.

55

15. Se transferă în BSC în camera cu atmosferă controlată.

16. Folosind echipamentul feeder pregătit anterior, se îmbină TP 1L cu mediu la una din liniile neutilizate de pe partea orificiului de probe al robinetului de închidere cu 3 căi cât mai aproape posibil de îmbinarea de etanșare, cu pierdere de tubaj cât mai mică.

17. Se așază echipamentul feeder în BSC.

18. Se conectează fiecare din cele pungi 3 feeder cu adaosul de la echipamentul feeder în singurul orificiu al pungii feeder.

19. Se rotește robinetul de închidere astfel încât TP 1L să fie în poziția "OFF".

20. Lucrând cu câte o pungă o dată, se deschid pensele de pe linia la punga feeder, se evacuează aerul din seringă și se extrage conținutul pungii feeder în seringă. Aerul evacuat din seringă ajută la recuperarea celulelor. Se închide pensa la punga feeder.

21. Se înregistrează volumul recuperat de celule feeder decongelate în fiecare pungă.

22. Se rotește robinetul de închidere astfel încât punga feeder este în poziția "OFF".

23. Se deschide pensa pe TP și se distribuie conținutul seringii în TP.

24. Se asigură că linia este curățată și se reînchide TP. Se poate extrage aer în seringă din TP pentru curățarea liniei.

25. Se amestecă bine celulele.

26. Se închide pensa la punga feeder.

27. Se rotește robinetul de închidere astfel încât orificiul seringii este în poziție "OFF". Se deconectează seringă de 60mL de robinetul de închidere.

28. Se înlocuiește cu seringă nouă pentru fiecare pungă feeder.

29. Se lasă seringă cuplată după ultima pungă.

30. Se amestecă bine compoziția feeder finală.

31. Se rotește robinetul de închidere astfel încât suspensia celulară feeder este în poziția "OFF".

32. Se amestecă bine celulele și, folosind o seringă de 5 mL și un orificiu fără ac, se clătește orificiul cu soluție celulară pentru a asigura prelevare exactă și se îndepărtează 1ml de celule, se introduc în tub etichetat pentru numărare.

33. Se repetă cu a doua seringă. Se efectuează o singură numărare pentru fiecare din aceste două probe independente.

34. Se rotește robinetul de închidere astfel încât suspensia feeder este în poziție "DESCHISĂ" și, folosind seringă de 60ml, se atașează la echipament, se evacuează aer în TP pentru curățarea liniei.

35. Se îndepărtează seringă și se acoperă orificiul luer cu un capac nou, steril.

36. Se etanșează termic TP pentru închidere, se îndepărtează echipamentul.

37. Se înregistrează masa pachetului de transfer cu suspensia celulară și se calculează volumul suspensiei celulare.

38. Se introduc în incubator.

39. Se efectuează o singură numărare a celulelor în proba de celule feeder, se înregistrează datele și se cuplează datele de numărare brute cu evidențele loturilor.

40. Se documentează programul de numărare Cellometer.

41. Se verifică dacă s-a introdus diluarea corectă în Cellometer.

42. Se calculează densitatea celulelor viabile totale în pachetul de transfer feeder.

43. Dacă numărul celulelor este $< 5 \times 10^9$, se decongelează mai multe celule, se numără și se adaugă în celule feeder.

44. Se cântărește din nou punga feeder și se calculează volumul.

45. Se calculează volumul celulelor de îndepărtat.

Adăugarea feeder în G-REX

1. Se îmbină steril un set de transfer 4" la TP feeder.

2. În BSC se atașează o seringă dimensionată corespunzător la conectorul luer interior conectat la pachetul de transfer feeder.

3. Se amestecă bine celulele și se îndepărtează volumul calculat în etapa 40 sau 41 pentru a obține 5.0×10^9 celule. Se elimină celulele neînsămânțate.

4. Folosind o seringă de 1mL și un ac 18G se extrag 0.150mL OKT3, se îndepărtează acul și se transferă în TP feeder prin conectorul luer interior.

5. Se clătește tubul și seringă cu celule feeder și se amestecă bine punga. Se curăță linia cu aer din seringă.

6. Se îndepărtează G-Rex 500MCS din incubator, se șterge cu alcool și se așază lângă SCD.

7. Se îmbină steril punga feeder cu linia roșie pe G-Rex 500MCS. Se deschide linia și se lasă celulele feeder să curgă în balon gravitațional.

8. Se asigură că linia fost complet curățată, apoi se etanșează linia aproape de închiderea inițială și se îndepărtează punga feeder.

9. Se reintroduce G-Rex 500MCS în incubator și se înregistrează ora.

Prepararea TIL: se înregistrează ora inițierii recoltării TIL

1. Se îndepărtează cu grijă G-Rex 100MCS din incubator și se închid toate pensele, cu excepția liniei de filtru.
- 5 2. Se conectează un pachet de transfer de 1L la linia roșie de pe G-REX 100MCS.
3. Se închide pensa pe TP de 300ml. Se etanșează termic -12 inci de la pungă, cu îndepărtarea adaosului. Se înregistrează greutatea/masa uscată.
4. Se îmbină steril pachetul de transfer de 300mL cu linia de colectare celulară de pe 100MCS aproape de etanșarea termică. Se închide linia.
- 10 5. Se eliberează toate pensele care duc la TP1L.
6. Folosind Gatherex se transferă ~900mL de supernatant de cultură în pachetul de transfer de 1L. Se oprește Gatherex când intră aer în linie. Se închide linia și se etanșează termic.
7. Se agită balonul până când toate celulele s-au desprins de membrană. Se verifică membrana pentru a asigura că toate celulele s-au desprins.
- 15 8. Se înclină balonul de la tubul de colectare și se lasă fragmentele tumorale să se depună pe margine.
9. Se înclină încet balonul către tubul de colectare astfel încât fragmentele rămân pe partea opusă a balonului.
10. Folosind Gatherex se transferă suspensia celulară reziduală în pachetul de transfer de 300mL evitând fragmentele tumorale.
- 20 11. Se verifică din nou dacă toate celulele s-au desprins de membrană.
12. Dacă este necesar, se spală, eliberând pensele pe Gatherex, și se lasă mediu să curgă în balonul G-Rex 100MCS gravitațional.
13. Se bate puternic balonul pentru a elibera celulele și se pompează în TP de 300ml.
- 25 14. După încheierea colectării, se închide linia roșie și se etanșează termic.
15. Se etanșează termic linia de colectare lăsând aproximativ aceeași lungime de tub ca la înregistrarea greutății uscate.
16. Se înregistrează masa (inclusiv masa uscată) TP de 300ml conținând suspensia celulară și se calculează volumul suspensiei celulare.
- 30 17. În BSC se conectează TP de 300ml cu un set de transfer plasmatic 4". Se amestecă bine celulele. Se atașează aseptice o seringă de 5mL, se extrage 1mL, se introduce în criofiolă. Se repetă cu a doua seringă. Se folosesc pentru numărarea celulelor, viabilitate.
18. Se reînchide și se înlocuiește capacul luer cu un capac luer steril nou.
- 35 19. Se introduce în incubator și se înregistrează ora așezării în incubator.
20. Se efectuează o singură numărare a celulelor pe fiecare probă, se înregistrează datele și se conectează datele de numărare brute la evidențele loturilor.
21. Se documentează programul de numărare Cellometer.
22. Se verifică dacă s-a introdus diluarea corectă în Cellometer.
- 40 23. Dacă este necesar, se ajustează densitatea TIL viabile totale la $\leq 2 \times 10^8$ celule viabile.
24. Se calculează volumul de îndepărtat sau se notează că nu este necesară ajustare.
25. În BSC se atașează aseptice o seringă dimensionată corespunzător în TP de 300ml.
26. Dacă este necesar, se îndepărtează volumul calculat al celulelor în tabelul "Calcul volum de îndepărtat".
- 45 27. Se închide și se etanșează termic TP de 300ml.
28. Se transferă surplusul de celule într-un tub conic dimensionat corespunzător și se introduce în incubator cu capacul desfăcut pentru crioconservare ulterioară.
29. Se îndepărtează G-Rex 500MCS din incubator și se așază lângă SCD.
30. Se îmbină steril TP de 300ml cu linia de admisie a pompei Acacia.
- 50 31. Se îmbină steril linia roșie a G-Rex 500MCS cu linia de ieșire a pompei Acacia.
32. Se pompează celulele în balon.
33. Se asigură că linia s-a curățat complet, apoi se etanșează termic linia roșie aproape de îmbinarea inițială.
34. Se verifică dacă toate pensele pe G-Rex 500MCS sunt închise, cu excepția liniei de filtru.
- 55 35. Se reintroduce G-Rex 500MCS în incubator și se înregistrează ora introducerii în incubator.
36. Se comandă și se asigură livrarea plăcilor de sedimentare la laboratorul de microbiologie.

Crioconservarea surplusului

Se calculează cantitatea de mediu de congelare care se va adăuga în celule:

TABEL 13: Concentrația celulară țintă a fost $1 \times 10^8/\text{ml}$

A. Se îndepărtează celulele totale (de la etapa 15)	mL
B. Concentrație celulară țintă	1×10^8 celule/mL
Volum de mediu de congelare de adăugat (A/B)	mL

37. Centrifugare TIL la $400 \times g$ 5 min la 20°C cu frânare completă și accelerație completă.
 38. Aspirare aseptică supernatant.
 39. Lovire ușoară a fundului tubului pentru resuspendarea celulelor în fluidul rămas.
 40. Odată cu lovirea ușoară a tubului se adaugă încet mediu de congelare preparat.
 41. Împărțire în părți alicote în criotuburi dimensionate corespunzător și se înregistrează ora introducerii celulelor la -80°C .

EXEMPLUL 7: PROCESUL 2A - ziua 16

Acest exemplu descrie protocolul detaliat din ziua 16 pentru procesul 2A descris în Exemplele 1 -

4. Monitorizarea mediului din camera cu atmosferă controlată - pre-procesare.
- 15 1. Cabinetele de biosecuritate s-au curățat cu șervețele mari saturate cu alcool sau pulverizare cu alcool.
 2. Se verifică numărul de particule cu 10 minute înaintea începerii procesării.
 3. Se organizează plăcile de monitorizare a procesului și se lasă în cabinetul de biosecuritate 1-2 ore în timpul procedurii.
- 20 Recoltare și numărare TIL.
 1. Se încălzește o pungă de 10L de CM4 pentru culturi inițiate cu mai puțin de 50×10^6 TIL într-un incubator de 37°C cel puțin 30 minute sau până când este gata de utilizare.
 2. În BSC se atașează aseptice un set de extensie Baxter la o pungă Labtainer de 10 L.
 3. Se îndepărtează balonul G-Rex 500MCS din incubator și se așază pe banc lângă GatheRex. Se verifică dacă toate pensele sunt închise cu excepția liniei de filtru. Se deplasează pensa pe linia de conectare rapidă lângă îmbinarea "T".
 4. Se îmbină steril Labtainer de 10L cu linia de recoltare roșie pe G-Rex 500MCS prin tubul sudabil de pe extensia Baxter.
 5. Se etanșează termic un pachet de transfer 2" de 2L sub "Y" cu îndepărtarea adaosului și se înregistrează greutatea uscată. Se îmbină steril TP 2L cu linia de colectare curată pe G-Rex 500MCS.
 6. Se așază G-Rex 500MCS pe o suprafață plană.
 7. Se deschid toate pensele care duc la Labtainer 10L și, folosind GatheRex, se transferă -4L de supernatant de cultură în Labtainer 10L.
 8. Recoltare conform instrucțiunilor de recoltare GatheRex adecvate.
- 35 9. Se închide linia roșie și se înregistrează ora recoltării inițiale TIL.
 10. Se oprește GatheRex când intră aer în linie. Se închide linia roșie.
 11. După îndepărarea supernatantului, se agită balonul până când toate celulele s-au desprins de membrană. Se înclină balonul pentru a asigura că furtunul se află la marginea balonului.
 12. Se eliberează toate pensele care duc la TP 2L și, folosind GatheRex, se transferă suspensia celulară reziduală în TP 2L, menținând marginea înclinată până când s-au colectat toate celulele.
 40 13. Se inspectează membrana cu privire la celule aderente.
 14. Dacă este necesar, se spală prin eliberarea penselor de pe linia roșie și se lasă mediu să curgă în balon gravitațional.
 15. Se închide linia roșie și se etanșează termic.
- 45 16. Se lovește puternic balonul pentru a elibera celulele.
 17. Se adaugă celule în TP 2L.
 18. Se etanșează termic pachetul de transfer de 2 L lăsând aproximativ aceeași lungime a tubului ca la înregistrarea greutateii uscate.
 19. Se reține G-Rex 500MCS, se reutilizează în separare.
- 50 20. Se înregistrează masa pachetului de transfer cu suspensia celulară și se calculează volumul suspensiei celulare.
 21. Se determină volumul suspensiei celulare, inclusiv masa uscată.
 22. Se îmbină steril un set de transfer 4" cu punga de suspensie celulară.

23. În BSC se amestecă ușor celulele și, cu seringă de 20cc, se extrag 11ml și se împart așa cum se indică în Tabelul 14:

TABEL 14. Parametrii de testare.

Test	Volum probă	Vas
Număr celule și viabilitate	2 probe de 2mL	Criofiole
Micoplasma	1 mL	Criofiola se depozitează la 4°C până la încheierea testării.
Sterilitate	1 mL	Se inoculează 0.5mL în câte un flacon de cultură anaerob și aerob
Debit	2 - 2mL	Număr celule neutilizate (crioconservate pentru testarea loturilor următoare)
Rest celule		Se elimină

- 5
24. Se etanșează termic. Se închide legătura luer reținând pensa
25. Se etichetează și se așază suspensia celulară în incubator, se înregistrează ora introducerii în incubator.
26. Se calculează volumul nou.
- 10 27. Se înregistrează volumul în pachetul de transfer de 2 L pe baza volumului suspensiei celulare și volumul se îndepărtează pentru QC (11 mL).
28. Se inoculează și se comandă testarea sterilității.
29. Se depozitează proba de micoplasmă la 4°C în suportul de așteptare pentru testarea micoplasmiei.
30. Se lasă de-o parte până la însămânțarea TIL.
- 15 **Număr celule:**
Se efectuează o singură numărare a celulelor, se înregistrează data și se conectează datele de numărare brute la evidențele loturilor. Se documentează diluarea. Se documentează programul de numărare Cellometer. Se verifică dacă s-a introdus diluarea corectă în Cellometer.
- 20 **Continuarea metodei:**
31. Se calculează numărul total al baloanelor necesare pentru subcultură
**Se reutilizează vasul inițial și fracțiile vaselor suplimentare se rotunjesc în sus.
- Adăugarea IL-2 în CM**
- 25 1. Se introduce punga de 10L de Aim V cu Glutamax în BSC.
2. Se conectează punga de mediu cu un set de transfer plasmatic 4".
3. Se atașează un ac 18G la o seringă de 10mL și se extrag 5mL de IL-2 în seringă (concentrația finală este 3000 IU/ml).
4. Se îndepărtează acul și se atașează aseptice seringă la set de transfer plasmatic și se distribuie IL-2 în pungă.
- 30 5. Se curăță linia cu aer, se extrage mediu și se distribuie în pungă. Se asigură că întreaga IL-2 se află în mediu.
6. Se repetă pentru restul pungilor de Aim V.
- Pregătirea baloanelor G-REX500MCS**
- 35 1. Se determină cantitatea de CM4 de adăugat în baloane. Se înregistrează volumul de celule adăugat per balon și volumul CM4 5000mL-A.
2. Se închid toate pensele cu excepția liniei de filtru.
3. Se îmbină steril linia de admisie a pompei Acacia cu setul de transfer plasmatic 4" de punga de mediu conținând CM4.
- 40 4. Se îmbină steril linia de ieșire a pompei cu G-Rex 500MCS prin linia de colectare roșie.
5. Se pompează cantitatea determinată de CM4 în G-Rex 500MCS folosind liniile de pe balon ca ghid.
6. Se etanșează termic linia roșie G-Rex 500MCS.
- 45 7. Se repetă etapele 4-6 pentru fiecare balon. Se pot umple mai multe baloane în același timp folosind umplere gravitațională sau mai multe pompe. Se poate atașa un conector "Y" la linia de ieșire a pompei și cele două brațe atașate de două baloane G-Rex 500MCS le umplu pe ambele în același timp.
8. Se așază baloanele la 37°C, 5% CO₂.

Însămânțarea baloanelor cu TIL

1. Se închid toate pensele pe G-Rex 500MCS cu excepția liniei de filtru.
2. Se îmbină steril punga de produs celular cu linia de admisie a pompei Acacia.
- 5 3. Se îmbină steril celălalt capăt al pompei cu linia roșie pe G-Rex 500MCS.
4. Se introduce conducta de pompare în pompă.
5. Se așază punga de produs celular pe cântarul analitic și se înregistrează ora adăugării TIL în balonul G-REX.
6. Cântarul este adus la zero.
- 10 7. Se deschid liniile și se pompează volumul necesar de celule în G-Rex 500MCS din greutate presupunând că 1g=1mL.
8. Se întoarce punga cu susul în jos și se pompează aer pentru curățarea liniei. Se etanșează termic linia roșie a G-Rex 500MCS. Se introduce balonul în incubator.
- 15 9. Se îmbină steril linia de ieșire a pompei cu următorul G-Rex 500MCS prin linia de colectare roșie.
10. Se amestecă bine celulele.
11. Se repetă transferul de celule pentru toate baloanele.
12. Se introduc baloanele la 37°C, 5% CO₂ și se înregistrează ora adăugării TIL în balonul G_REX.
13. Se comandă testarea plăcilor de sedimentare în laboratorul de microbiologie.
- 20 14. Se înregistrează numerele de referință.
15. Se comandă testarea sterilității aerobe și anaerobe.
16. Se asigură livrarea plăcilor și flacoanelor în laboratorul de microbiologie.

Crioconservarea celulelor în curgere sau în exces:

- 25 1. Se calculează cantitatea de mediu de congelare necesar:
 - a. Concentrația celulară țintă a fost 1 x 10⁸/ml; se înregistrează celulele totale îndepărtate. Concentrația celulară țintă a fost 1x10⁸ celule/mL. Se calculează volumul total al mediului de congelare de adăugat.
- 30 2. Se prepară mediul de crioconservare și se așază la 40°C până la utilizare.
3. Centrifugare TIL la 400 x g timp de 5 min at 20°C cu frânare completă și accelerație completă.
4. Aspirare aseptică supernatant.
5. Lovire ușoară a fundului tubului pentru resuspendarea celulelor în fluidul rămas.
- 35 6. Odată cu lovirea ușoară a tubului, se adaugă încet mediu de congelare preparat.
7. Se împarte în părți alicote în criotuburi etichetate dimensionate corespunzător.
8. Se introduce fiola în Mr. Frosty sau echivalent și se așază într-un congelator la -80°C.
9. În 72 ore se transferă în locul de depozitare permanentă și se documentează și se înregistrează data și ora introducerii în congelator la -80°C.

EXEMPLUL 8: PROCESUL 2A - ziua 22

- 40 Acest exemplu descrie protocolul detaliat din ziua 22 pentru procesul 2A descris în Exemplele 1 -
4. 4.

Documentarea rezultatelor negative ale sterilității procesului

- 45 Înaintea începerii recoltării, se obțin rezultatele preliminare ale sterilității din ziua 16 de la laboratorul de microbiologie. Se contactează directorul laboratorului sau persoana responsabilă pentru alte instrucțiuni dacă rezultatele sunt pozitive.

Monitorizarea mediului camerei cu atmosferă controlată - pre-procesare

- 50 1. Se verifică numărul de particule cu 10 minute înaintea începerii procesării.
2. Cabinetele de biosecuritate s-au curățat cu șervețele mari saturate cu alcool sau pulverizare cu alcool.
3. Se organizează plăcile de monitorizare a procesului și se lasă în cabinetul de biosecuritate 1-2 ore în timpul procedurii.

Preparare în avans

- 55 1. În BSC se atașează aseptice un set de extensie Baxter la o pungă Labtainer de 10L sau echivalent. Se etichetează punga de filtrat LOVO.
2. Se introduc trei pungi de 1L de PlasmaLyte A în BSC
3. Se prepară colecția și se etichetează pungile PlasmaLyte A cu 1% HSA:

3.1. Se închid toate pensele pe un set de conectori 4S-4M60 și se conectează fiecare dintre pungile PlasmaLyte.

3.2. Se conectează unul dintre conectorii exteriori ai 4S-4M60 la linia de admisie a pompei Acacia.

5 3.3. Se conectează linia de ieșire a pompei la o pungă de colectare de 3 litri. Se închid toate pensele pe punga de 3L cu excepția liniei de pompare.

3.4. Se pompează cei 3 litri de Plasmalyte în punga de 3 litri. Dacă este necesar, se îndepărtează aerul din punga de 3L prin inversarea pompei.

3.5. Se închid toate pensele cu excepția liniei cu conectorul luer interior.

10 3.6. Folosind două seringi de 100 mL și ace 16-18G, se încarcă 120 mL de 25% HSA. Seringile se astupă.

3.7. Se atașează o seringă la conectorul luer interior pe punga de 3 litri și se transferă HSA în punga de PlasmaLyte 3L. Se amestecă bine.

3.8. Se repetă cu a doua seringă.

15 3.9. Se amestecă bine.

3.10. Se închid toate pensele.

3.11. Folosind o seringă de 10mL, se îndepărtează 5 mL de PlasmaLyte cu 1%HSA din orificiul fără ac pe punga de 3 litri.

3.12. Se astupă seringă și se menține în BSC pentru diluarea IL-2.

3.13. Se închid toate pensele.

20 3.14. Se etanșează termic, cu îndepărtarea liniei conectorului luer interior de la conducta de pompare.

3.15. Se etichetează tamponul de spălare LOVO și se datează. Expiră în 24 h la temperatura ambiantă.

Prepararea IL-2

25

1. Se distribuie Plasmalyte/1%HSA din seringă de 5 mL într-un tub conic de 50 ml steril etichetat.

2. Se adaugă 0.05mL soluție IL-2 în tubul conținând PlasmaLyte.

3. Se etichetează IL-2 6×10^4 .

4. Se astupă, se etichetează și se depozitează la 2-8°C. Se înregistrează volumele.

30

Prepararea celulelor

1. Se închid toate pensele pe o pungă Labtainer de 10 L. Se atașează setul de extensie Baxter la punga de 10L prin legătura luer.

2. Se îndepărtează baloanele G-REX 500M de la 37°C.

35 3. Se îmbină steril linia roșie de îndepărtare a mediului din G-Rex 500MCS cu setul de extensie pe punga de bioprocesare de 10L.

4. Se îmbină steril linia de îndepărtare a celulelor curate din G-Rex 500MCS într-o pungă de colectare de 3L și se etichetează "suspensie celulară colectată".

5. Se deschide linia roșie și punga de 10L.

40 6. Se utilizează pompa GatheRex, s-a redus volumul primului balon.

Obs.: dacă se detectează o bulă de aer, pompa se poate opri prematur. Dacă reducerea volumului nu este completă, se reactivează pompa GatheRex.

7. Se închide pensa pe punga de supernatant și linia roșie.

45 8. Se agită balonul G-REX 500M până când TIL sunt complet resuspendate, evitând stropirea sau spumarea. Se asigură că s-au desprins toate celulele de membrană.

9. Se deschid pensele pe linia curată și punga de 3L.

10. Se înclină balonul G-Rex astfel încât suspensia celulară se colectează în partea balonului în care a fost dispus tubul de colectare.

50 11. GatherRex începe colectarea suspensiei celulare. Obs.: dacă tubul de colectare celulară nu se află la îmbinarea peretelui cu membrana inferioară, lovirea balonului înclinat la un unghi de 45° este de obicei suficientă pentru poziționare adecvată a tubului.

12. Se asigură că s-au îndepărtat toate celulele din balon.

13. Dacă au rămas celule în balon, se adaugă 100mL de supernatant înapoi în balon, se agită și se colectează în punga de suspensie celulară.

55 14. Se închide pensa pe linia la punga de colectare a celulelor. Se eliberează pensele pe GatheRex.

15. Se etanșează termic linia curată a G-Rex 500MCS.

16. Se etanșează termic linia roșie a G-Rex 500MCS.

17. Se repetă etapele 3-16 pentru alte baloane.

18. A fost necesară înlocuirea pungii de supernatant de 10L, după necesitate, după fiecare al doilea balon.

19. Se pot folosi mai multe GatherRex.

20. Se documentează numărul G-Rex 500MCS procesate.

5 21. Se etanșează termic punga de colectare a celulelor. Se înregistrează numărul G-REX recoltate.

22. Folosind un marker, se face un semn ~2" de la unul dintre conectorii luer interiori pe o pungă de colectare nouă de 3 litri.

23. Se etanșează termic și se îndepărtează conectorul luer interior chiar sub semn.

10 24. Se etichetează punga sursă LOVO.

25. Se înregistrează greutatea uscată.

26. Se închid toate pensele unui filtru de sânge de 170 μm.

27. Se îmbină steril capătul terminal al filtrului cu punga sursă LOVO chiar sub semn.

28. Se îmbină steril o linie sursă a filtrului cu punga conținând suspensia celulară.

15 29. Se ridică suspensia celulară prin suspendarea celulelor pe un suport IV pentru a iniția un transfer gravitațional al celulelor. (Obs.: nu se lasă punga sursă să atârne de la aparatul de filtrare.)

30. Se deschid toate pensele necesare și se lasă TIL să se scurgă din punga de suspensie celulară prin filtru în punga sursă LOVO.

31. După ce se transferă toate celulele în punga sursă LOVO, se închid toate pensele, se etanșează termic chiar deasupra semnelor și se desface pentru îndepărtarea filtrului.

20 32. Se amestecă bine punga și, folosind două seringi de 3mL, se prelevează 2 probe de 2 mL independente din orificiul de prelevare al seringii pentru numărarea celulelor și viabilitate.

33. Se cântărește punga și se determină diferența între greutatea inițială și finală.

34. Se înregistrează data și se introduce în incubator, inclusiv masa uscată.

Numărarea celulelor.

25 Se efectuează o singură numărare a celulelor pe fiecare probă și se înregistrează data și se atașează datele de numărare brute la evidențele loturilor. Se documentează programul de numărare Cellometer. Se verifică dacă s-a introdus diluarea corectă în Cellometer. Se determină numărul total al celulelor nucleate. Se determină numărul TNC de îndepărtat pentru a reține = 1.5×10^{11} celule pentru procesare LOVO. Celulele îndepărtate se introduc într-un recipient cu dimensiune adecvată pentru eliminare.

Recoltarea LOVO

30 Labtainer de 10L cu setul de extensie Baxter din prepararea anterioară a fost punga de filtrat de înlocuire atașată la kitul LOVO. Se pornește LOVO și se urmează afișările de pe ecran.

Verificarea cântarelor și senzorului de presiune

Pentru a accesa profilul de operare a instrumentului (*Instrument Operation Profile*):

35 1. Se atinge butonul de informații.

2. Se atinge fila de setări instrument.

3. Se atinge butonul profilul de operare a instrumentului.

4. Se afișează profilul de operare a instrumentului.

Verificarea cântarelor

40

1. Se asigură că nu există nimic pe nici un cântar și se verifică indicațiile pentru fiecare cântar.

2. Dacă unul dintre cântare indică o valoare în afara unui interval 0 +/- 2 g, se efectuează calibrarea așa cum se descrie în manualul de calibrare a cântarului de la producător.

45 3. Dacă toate cântarele sunt în limitele de toleranță fără greutate pe ele, se așază o greutate de 1-kg pe fiecare cântar (#1-4) și se verifică indicația.

4. Dacă unul dintre cântare indică o valoare în afara unui interval 1000 +/- 10 g când pe acesta se află o greutate de 1-kg, se efectuează calibrarea descrisă în manualul operatorului LOVO de la producător

Verificarea senzorului de presiune

50

1. Se verifică indicația senzorului de presiune pe ecranul profilului de operare a instrumentului.

2. N/A: dacă indicația senzorului de presiune a fost în afara valorii de 0 +/- 10 mmHg, se memorează o nouă setare a presiunii atmosferice în regimul de întreținere așa cum se descrie în manualul operatorului LOVO de la producător.

55 a. Se atinge butonul de verificare pe ecranul profilului de operare a instrumentului.

b. Se atinge butonul de verificare din fila Setări instrument (*Instrument Settings*).

3. Dacă s-a efectuat calibrarea cântarului sau s-a memorat o nouă setare a presiunii atmosferice, se repetă secțiunile relevante.

Pentru a începe procedura, se selectează protocolul recoltare G-Rex TIL ("TIL G-Rex Harvest") din meniul derulant pe ecranul Selecție protocol și se apasă Start.

1. Se afișează ecranul Configurare procedură.
2. Se atinge butonul Informații soluții.
3. Se afișează ecranul Soluție 1. Se analizează tipul de tampon de spălare necesar pentru Soluția 1. (ar trebui să fie PlasmaLyte.)
- 5 4. Se atinge butonul Next (continuare) pentru a avansa la ecranul Soluție 2. Se verifică tipul de tampon de spălare necesar pentru Soluția 2. (ar trebui să indice "NICI UNUL", indicând că protocolul a fost configurat să folosească numai un tip de tampon de spălare, care este PlasmaLyte)
5. Se atinge butonul de verificare de pe ecranul Informații soluția 2 pentru a reveni la ecranul Configurare procedură.
- 10 6. Se atinge butonul Informații procedură.
7. Se afișează ecranul Informații procedură.
8. Se atinge câmpul de introducere a datelor de identificare ale utilizatorului. Se va afișa o tastatură. Se introduc inițialele operatorului și cerficatorului. Se atinge butonul de acceptare a datelor introduse.
9. Se atinge câmpul de introducere ID sursă. Se va afișa o tastatură. Se introduce nr. de lot al produsului.
- 15 Se atinge butonul de acceptare a datelor introduse.
10. Se atinge câmpul de introducere ID procedură. Se va afișa o tastatură. Se introduce "Recoltare TIL". Se atinge butonul de acceptare a datelor introduse.
11. Dacă sunt alte observații de înregistrat, se atinge câmpul de introducere Observații procedură. Se afișează o tastatură. Se introduc observațiile. Se atinge butonul de acceptare a datelor introduse.
- 20 **NOTĂ: câmpul de introducere Observații procedură este opțional și poate fi lăsat gol.**
12. Se atinge butonul de verificare pe ecranul Informații procedură pentru a reveni la ecranul Configurare procedură.
13. Se verifică dacă se afișează o "confirmare" în butonul Informații procedură. Dacă nu se afișează nici o "confirmare", se atinge din nou butonul Informații procedură și se asigură că s-au introdus date în toate
- 25 câmpurile ID utilizator, ID sursă și ID procedură.
14. Se atinge butonul Configurare parametri.
15. Se afișează ecranul Informații generale procedură.
16. Se atinge câmpul de introducere Volum sursă (mL). Se afișează tastatura numerică. Se introduce Volum calculat suspensiei celulare (mL) din tabelul 1.
- 30 17. Se atinge butonul de acceptare a datelor introduse.
18. Se atinge câmpul de introducere PCV sursă (%). Se afișează ecranul TIL (viabile+moarte).
19. Se atinge câmpul de introducere Concentrație celule. Se afișează tastatura numerică. Se introduce Concentrația celulară totală /mL din tabelul 14 în Sursă produs în unități de "x 10⁶/mL". Informația poate fi cuprinsă între 00.0 și 99.9. Se atinge butonul de acceptare a datelor introduse și se revine în ecranul
- 35 Informații generală procedură. NOTĂ: după ce s-a acceptat Concentrația celulară, câmpul de introducere PCV sursă (%) pe ecranul Informații generale procedură afișează PCV % calculat de LOVO, pe baza valorii concentrației celulare introduse de operator.
20. Pe ecranul Procedură generală, se atinge butonul Next pentru a avansa la ecranul 4 din 8, ecranul Volum produs final (volum reținut). Notă: ecranele 2 și 3 nu au câmpuri de introducere pentru a fi
- 40 completate de operator.
21. Se afișează ecranul Volum produs final (volum reținut).
22. Folosind valoarea Celule nucleate totale (TNC) din tabelul 15, se determină volumul țintă al produsului final din tabelul de mai jos (tabel 16). Se introduce volumul produsului final (mL) asociat cu intervalul celular din configurarea procedurii LOVO.

45

TABEL 15. Determinarea volumului țintă al produsului final.

Interval celular	Volum produs final (reținut) țintă (mL)
$0 < \text{celule totale (viabile + moarte)} \leq 7.1E10$	150
$7.1E10 < \text{celule totale (viabile + moarte)} \leq 1.1E11$	200
$1.1E11 < \text{celule totale (viabile + moarte)} \leq 1.5E11$	250

TABEL 16. Volum produs țintă.

Celule nucleate totale (TNC) x10 ⁶	Volum produs final (reținut) țintă (mL)
-----------------------------------------------	-----------------------------------------

50

23. Pentru a obține volumul specificat din tabelul 16 se atinge câmpul de introducere Volum produs final (mL). Se afișează o tastatură numerică. Se introduce volumul dorit al produsului final în

unitate de mL. Se atinge butonul de acceptare a datelor introduse.

24. Se atinge ecranul Volum produs final (volum reținut) pentru a reveni la ecranul Configurare procedură. Notă: ecranele 5-8 nu au câmpuri de introducere pentru a fi completate de operator.

25. Se verifică dacă se afișează o "confirmare" la butonul Configurare parametri. Dacă nu se afișează "verificare", se atinge din nou butonul Informații procedură și se asigură că s-au completat Volum sursă și PCV sursă pe pagina 1. Se asigură că s-a bifat căsuța de confirmare pentru Volum produs final minim țintă sau Volum produs final (mL) pe pagina 4.

26. Se atinge butonul Estimare în colțul dreapta sus al ecranului.

27. Se afișează ecranul Rezumat estimare. Se confirmă valorile suficiente și exacte pentru Sursă și Tampon spălare PlasmaLyte.

28. Se încarcă kitul consumabil: se urmează instrucțiunile de pe ecran pentru încărcarea kitului selectând butonul de asistență (help) "(?)".

29. Se notează volumele afișate pentru Filtrat și Soluția 1 (PlasmaLyte).

30. Se notează volumele afișate pentru Filtrat și Soluția 1 (read PlasmaLyte).

31. Pentru instrucțiuni privind încărcarea kitului consumabil se atinge butonul help sau se urmează instrucțiunile din manualul de utilizare pentru instrucțiuni detaliate.

32. Când s-a încărcat kitul consumabil LOVO standard, se atinge butonul Next. Se afișează ecranul Informații recipient și poziționare. Se îndepărtează punga de filtrat de pe cântar #3.

33. Pentru acest protocol, recipientul de filtrat este nou și în afara cântarului.

34. Dacă recipientul de filtrat a fost deja indicat ca nou și în afara cântarului, nu se fac modificări.

35. Dacă recipientul de filtrat este indicat ca Original, se atinge butonul Original pentru a comuta la Nou.

36. Dacă poziția filtratului este indicată pe cântar, se atinge butonul pe cântar pentru a comuta în afara cântarului.

37. Dacă volumul filtratului de generat este ≤ 2500 mL, poziționarea recipientului de filtrat este indicată pe cântar pentru constanță între cicluri, poziționarea recipientului de filtrat se modifică în afara cântarului și tipul recipientului este "nou".

38. Se atinge butonul pe cântar pentru a comuta la în afara cântarului. Se atașează setul de transfer Utilizare tehnică de îmbinare sterilă pentru a înlocui recipientul de filtrat al kitului consumabil LOVO cu o pungă de 10-L. Se deschide îmbinarea.

39. Se așază recipientul de filtrat pe banc. NU se așază punga de filtrat pe cântar #3. Cântarul #3 este gol în timpul procedurii.

40. Se deschid pensele de plastic de pe tubul care duce la recipientul de filtrat. NOTĂ: dacă tubul s-a îndepărtat de pensa F în timpul îmbinării, se înlocuiește pensa.

41. Se atinge câmpul de introducere Capacitate recipient filtrat. Se afișează o tastatură numerică. Se introduce capacitatea totală a filtratului nou (10.000 mL). Se atinge butonul de "confirmare" pentru a accepta datele introduse.

42. Se utilizează tehnica de îmbinare sterilă pentru a înlocui recipientul de filtrat al kitului consumabil LOVO cu o pungă de 10L. Se deschide îmbinarea. NOTĂ: dacă tubul s-a îndepărtat de pensa F în timpul îmbinării, se înlocuiește pensa.

43. Se așază recipientul de filtrat nou pe banc. NU se așază punga de filtrat pe cântar #3. Cântarul #3 este gol în timpul procedurii.

44. Se deschid pensele de plastic de pe tubul care duce la recipientul de filtrat.

45. Pentru recipientul de material reținut, ecranul afișează original și pe cântar.

46. Nu se fac modificări la recipientul de material reținut.

47. După ce s-au făcut toate modificările la recipient filtrat și s-au introdus informațiile corespunzătoare, se atinge butonul Next.

48. Se afișează segmentul Confirmare kit consumabil. Se verifică dacă kitul a fost încărcat în mod adecvat, apoi se apasă butonul da.

49. Toate pensele mecanice LOVO se închid automat și se afișează ecranul Verificare instalare kit consumabil. LOVO parcurge o serie de etape de presurizare pentru verificarea kitului.

50. După ce kitul consumabil a trecut cu succes de verificare, se afișează ecranul Soluții conectare.

51. 3L este volumul de spălare. Se introduce această valoare pe ecran.

52. Se utilizează tehnica de îmbinare sterilă pentru atașarea pungii de 3-L de PlasmaLyte de tubul care trece prin pensa 1. Se deschide îmbinarea.

53. Se atârână punga de PlasmaLyte de un suport IV.

54. Se deschid pensele de plastic pe tubul care duce la punga PlasmaLyte.

55. Se verifică dacă s-a introdus valoarea volumului de soluție de 3000mL. Aceasta s-a introdus anterior.

56. Se atinge butonul Next. Se afișează segmentul Inițiere kit consumabil. Se verifică dacă s-a atașat PlasmaLyte și îmbinările și pensele de plastic de pe tubul care duce la PlasmaLyte s-au deschis, apoi se

atinge butonul da. NOTĂ: deoarece se folosește un singur tip de tampon de spălare (PlasmaLyte) în întreaga procedură LOVO, nu se atașează soluție la tubul care trece prin pensa 2. Pensa Roberts de pe acest tub rămâne închisă în timpul procedurii.

57. Începe inițierea kitului consumabil și se afișează ecranul Inițiere kit consumabil. Se observă vizual deplasarea PlasmaLyte prin tubul conectat la punga de PlasmaLyte. Dacă nu se deplasează fluid, se apasă butonul Pauză pe ecran și se determină dacă o pensă sau o îmbinare este încă închisă. După rezolvarea problemei, se apasă butonul Reluare pe ecran pentru a relua inițierea kitului consumabil.
58. După ce inițierea kitului consumabil s-a încheiat cu succes, se afișează ecranul Conectare sursă.
59. Pentru acest protocol, recipientul sursă este nou și în afara cântarului.
60. Dacă recipientul sursă a fost deja indicat ca nou și în afara cântarului, nu se fac modificări.
61. Dacă poziția sursă este indicată pe pe cântar, se atinge butonul pe cântar pentru a comuta la în afara cântarului.
62. Se atinge câmpul de introducere Capacitate sursă (mL). Se afișează tastatura numerică. Se introduce capacitatea recipientului care conține produsul sursă. Se atinge butonul de verificare pentru acceptarea datelor introduse. Notă: valoarea Capacitate sursă introdusă se utilizează pentru a asigura că punga sursă poate conține soluția suplimentară adăugată în pungă în timpul fazei de inițiere a sursei.
63. Se utilizează tehnica de îmbinare sterilă pentru a atașa recipientul sursă de tubul care trece prin pensa S. Se deschide îmbinarea. Se îndepărtează tubul de pe pensă, după necesitate.
64. Se asigură înlocuirea tubului sursă în pensa S.
65. Se atinge butonul Next. Se afișează segmentul Inițiere sursă. Se verifică dacă s-a atașat sursa la kitul consumabil și îmbinările și pensele de plastic de pe tubul care duce la sursă sunt deschise, apoi se atinge butonul da.
66. Începe inițierea sursei și se afișează ecranul Inițiere sursă. Se observă vizual deplasarea PlasmaLyte prin tubul conectat la punga sursă. Dacă nu se deplasează fluid, se apasă butonul Pauză pe ecran și se determină dacă o pensă sau o îmbinare este încă închisă. După rezolvarea problemei, se apasă butonul Reluare pe ecran pentru a relua inițierea sursei.
67. După ce inițierea sursei s-a încheiat cu succes, se afișează ecranul Start procedură.
68. Se apasă butonul Start. Apare ecranul de pauză "Ciclu pre-spălare 1", cu instrucțiunile "acoperire IP, amestecare sursă".
69. Se acoperă punga IP.
70. Înaintea apăsării butonului Start, se îndepărtează punga IP de pe cântar #2 (se poate îndepărta și tubul de la ghidajul de la orificiul superior IP) și se se răstornă manual pentru a permite tamponului de spălare adăugat în etapa de inițiere a kitului consumabil să acopere toate suprafețele interioare ale pungii.
71. Se așază din nou punga IP pe cântar #2 (eticheta de pe pungă este orientată către stânga). Se înlocuiește tubul de la orificiul superior în ghidaj dacă a fost îndepărtat.
72. Se amestecă punga sursă.
73. Înaintea apăsării butonului Start, se îndepărtează punga sursă de pe cântar #1 și se răstoarnă de câteva ori pentru a crea o suspensie celulară omogenă.
74. Se reaşază punga sursă pe cântar #1 sau suportul IV. Se asigură că punga nu se leagănă.
75. Se apasă butonul Start.
76. LOVO începe procesarea fluidului din punga sursă și se afișează ecranul Ciclu spălare 1.

În timpul procedurii LOVO, sistemul se întrerupe automat pentru a-i permite operatorului să interacționeze cu diferite pungi. Se afișează diferite ecrane în timpul pauzelor diferite. Se urmează instrucțiunile corespunzătoare pentru fiecare ecran.

Pauză de clătire a sursei

După scurgerea pungii sursă, LOVO adaugă tampon de spălare în punga sursă pentru a clăti punga. După ce s-a adăugat volumul configurat de tampon de spălare în punga sursă, LOVO se întrerupe automat și afișează ecranul Pauză clătire sursă.

- Când se afișează ecranul Pauză clătire sursă, operatorul:
1. Îndepărtează punga sursă de pe cântar #1.
 2. Întoarce punga sursă de câteva ori pentru a permite tamponului de spălare să atingă întregul interior al pungii.
 2. Reaşază punga sursă pe cântar #1. Se asigură că punga sursă nu se leagănă pe cântar #1.
 4. Apasă butonul Reluare.
- LOVO procesează fluidul de clătire din punga sursă, apoi continuă procedura automată.

Pauză de amestecare a pungii IP

Pentru pregătirea celulelor pentru o altă trecere prin centrifugă, punga IP se diluează cu tampon de spălare. După adăugarea tamponului de spălare în punga IP, LOVO se întrerupe automat și afișează ecranul Pauză "amestecare pungă IP".

5 Când se afișează ecranul Pauză "amestecare pungă IP", operatorul:

1. Îndepărtează punga IP de pe cântar #2. Poate îndepărta și tubul de la ghidajul orificiului superior IP.

2. Întoarce punga IP de câteva ori pentru a amesteca bine suspensia celulară.

10 3. Reașază punga IP pe cântar #2. Înlocuiește de asemenea tubul orificiului superior IP în ghidaj, dacă a fost îndepărtat. Se asigură că punga IP nu se leagă pe cântar #2.

4. Apasă butonul Reluare. LOVO începe procesarea fluidului din punga IP.

Pauză de masare a colțurilor IP

15 În timpul ciclului de spălare final al procedurii LOVO, celulele se pompează din punga IP, prin centrifugă în punga de (produs final) reținut. Când punga IP este goală, se adaugă 10 mL tampon spălare în orificiul inferior al pungii IP pentru a o clăti. După adăugarea fluidului de clătire, LOVO se întrerupe automat și afișează ecranul de Pauză "masare colțuri IP".

Când se afișează ecranul Pauză "masare colțuri IP", operatorul:

1. Nu îndepărtează punga IP de pe cântar #2.

20 2. Cu punga IP încă așezată pe cântar #2, se masează colțurile pungii pentru a aduce celulele reziduale în suspensie.

3. Se asigură că punga IP nu se leagă pe cântar #2.

4. Apasă butonul Reluare.

5. LOVO începe pomparea fluidului de clătire din punga IP.

25 La sfârșitul procedurii LOVO, se afișează ecranul Îndepărtare produși. Când se afișează acest ecran, toate pungile din kitul LOVO pot fi manipulate.

Notă: Nu se atinge nici o pungă până la afișarea ecranului Îndepărtare produși.

Se introduce o pensă hemostatică pe tub foarte aproape de orificiul de pe punga de material reținut pentru ca suspensia celulară să nu se depună în tub și se etanșează termic în trei puncte sub hemostat.

Se îndepărtează punga de produs reținut prin ruperea sigiliului central și se transferă în BSC.

30 Se urmează instrucțiunile de pe ecranul Îndepărtare produși.

Se atinge butonul Next. Toate pensele mecanice LOVO se deschid și se afișează ecranul Îndepărtare kit.

Se urmează instrucțiunile de pe ecranul Îndepărtare kit, apoi se continuă.

35 Se atinge butonul Next. Toate pensele mecanice LOVO se închid și se afișează ecranul Rezumat rezultate. Se înregistrează datele din ecranul Rezumat rezultate în Tabelul 17. Se închid toate pompele și se filtrează suportul.

TABEL 17. Tabel centralizator al rezultatelor LOVO.

Timp procesare scurs (paranteze #)	Timp procesare sursă scurs (paranteze #)	Timp pauză	Volum sursă (mL)	Volum reținut (mL)	Volum filtrat (mL)	Volum soluție 1 (mL)
A.	B.	C.	D.	E.	F.	G.

40 Se atinge butonul Next. Se afișează ecranul Selecție protocol.

Procedura de oprire LOVO

1. Se asigură că toate pensele sunt închise și suportul filtrului este în poziție verticală.

2. Se atinge butonul STOP pe partea frontală LOVO.

45 3. Se afișează segmentul Decizie buton STOP.

4. Se afișează segmentul Confirmare oprire.

5. Se atinge butonul da. Se afișează ecranul Oprire.

6. După câteva secunde, se afișează ecranul Deconectare. Când se afișează acest ecran, se oprește LOVO folosind comutatorul din stânga spate a instrumentului.

50 Se înregistrează volumul de produs preparat final într-un tabel.

Calculul cantității de IL-2 necesar din tabelul de produs final

A. Se calculează cantitatea de IL-2 necesară pentru produs final. (300 IU/mL de produs IL-2 final):

Volum produs final (ml) [volum produs celular preparat din tabelul de volum al produsului preparat final]
x 300IU/mL = IU IL-2 necesar

_____ ml X _____ 300IU _____ = _____ IU IL-2 necesar

B. IU IL-2 necesar ÷ diluare soluție de lucru (concentrație 6×10^4 IU/mL) preparată în etapa de preparare IL-2 = volum (ml) IL-2 de adăugat în produs final.

_____ IU IL-2 necesar de mai sus ÷ 60.000 IU/mL = _____ mL soluție IL-2
soluție de lucru

Determinarea numărului de criorecipiente și a volumului reținut

Se marchează în tabelul volum țintă și reținut de mai jos numărul pungilor de crioprezervare și volumul probei de reținere pentru produs.

5 Calcul volum țintă/pungă: (volum preparat final - ajustare volum fiindcă nu s-a obținut recuperare 100% = 10 mL)/# pungi.

Preparare celule cu 1:1 (vol:vol) CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions) și IL-2.

1. Asamblare aparat de conectare

10 1.1. Se îmbină steril criorecipientele CS750 la aparatul CC2 Cell Connect înlocuind unul din conectorii luer exteriori distali pentru fiecare pungă.

1.2. Se mențin pensele în poziție închisă.

1.3. Se etichetează pungile 1-4.

2. Se prepară celulele cu IL-2 și se conectează aparatul.

15 2.1. În BSC se conectează punga de produs celular cu un set de transfer plasmatic 4" cu conectorul luer interior. Se asigură că pensa este închisă pe setul de transfer.

2.2. Cu o seringă de dimensiune adecvată, se extrage volumul de diluare IL-2 determinat din tabelul de produs final.

2.3. Se distribuie în produsul LOVO.

20 2.4. Se îmbină steril punga de produs LOVO cu linia CC2, cu îndepărtarea adaosului.

2.5. Se introduc celulele și aparatul în punga de transport și se așază la $2-8^{\circ}\text{C} \leq 15$ min.

3. Adăugarea CS10.

3.1. În BSC se atașează robinetul de închidere cu 3 căi la conectorul luer exterior pe punga de CS10 rece.

25 3.2. Se atașează seringă de dimensiune adecvată la conectorul luer interior al robinetului de închidere.

3.3. Se deschide punga și se extrage cantitatea de CS 10 determinată în tabelul "Volum produs preparat final".

3.4. Se îndepărtează seringă și se astupă.

3.5. Se repetă dacă sunt necesare mai multe seringi.

30 3.6. Se îndepărtează celulele/aparatul CC2 din frigider la $2-8^{\circ}\text{C}$ și se introduc în BSC.

3.7. Se atașează prima seringă conținând CS10 de conectorul luer central al robinetului de închidere. Se rotește robinetul de închidere astfel încât linia la pungile CS750 să fie în poziție "OFF" (închisă).

3.8. Se amestecă încet și ușor, se adaugă CS10 (1:1, vol:vol) în celule.

35 3.9. Se repetă pentru seringi suplimentare de CS10.

Adăugarea produsului celular preparat în criorecipiente

40 1. Se înlocuiește seringă cu seringă de dimensiune adecvată pentru volumul de celulele de introdus în fiecare criorecipient.

2. Se amestecă produsul celular.

3. Se deschide pensa care duce la punga de produs celular și se extrage volumul adecvat.

4. Se rotește robinetul de închidere astfel încât punga de produs celular este în poziția "OFF" și se distribuie conținutul seringii în criorecipientul #1. Se curăță linia cu aer din seringă.

45 **Înregistrarea volumului de produs final**

1. Folosind un orificiu fără ac și seringă de dimensiune adecvată, se extrage cantitatea de produs reținut determinată anterior.

2. Se introduce produsul reținut în tub conic de 50 mL etichetat "reținere".

3. Folosind seringă atașată la echipament, se îndepărtează tot aerul din pungă, extrăgând celulele până la circa 1" dincolo de pungă în tub. Se închide și se etanșează termic. Se așază la 2-8°C.

4. Se rotește robinetul de închidere astfel încât criorecipientele să fie în poziție "OFF".

5. Se amestecă celulele în punga de produs celular și se repetă etapele 3-8 pentru restul pungilor CS750 folosind o seringă nouă pe robinetul de închidere și o seringă nouă pentru a obține celulele reținute.

6. Produsul reținut se lasă de-o parte pentru procesare când produsul se află în CRF.

Procedura congelatorului cu control al ratei de îngheț (CRF) (vezi și Exemplul 9)

1. Se deschide CRF (congelator cu rată controlată de îngheț CryoMed, model 7454) și laptopul asociat.

2. Se introduc în computer contul și parola.

3. Se deschide simbolul Congelator cu rată controlată de îngheț de pe desktop.

4. Se face click pe butonul Run de pe ecranul principal.

5. Se face click pe Deschidere profil, se apasă Deschide.

6. Se introduce numele fișierului de pornire urmat de dată în format: runLLZZAAA.

7. Se introduce eticheta Dată fără linii în format LLZZAAA.

8. Se închide ușa CRF.

9. Se face click pe Start.

10. Se selectează COM 6 pe meniul derulant.

11. Se face click pe Ok. Se așteaptă circa 30 secunde.

12. Când apare "Descarcă profil", se face click pe OK. Se face click pe Salvează. (vezi Exemplul 9 pentru detalii ale profilului de congelare cu rată controlată de îngheț.)

13. Se așteaptă apăsarea butonului verde până când toate probele sunt în CRF. Congelatorul se menține la 4°C până la adăugare.

14. Se adaugă probele în CRF.

15. Se așteaptă până când CRF revine la 4°C. După ce se atinge temperatura, se face click pe butonul verde de continuare. Se inițiază programul pentru continuare la etapa următoare.

16. Se efectuează o inspecție vizuală a criorecipientelor cu privire la următoarele (Notă: nu se inspectează pentru sub- sau supraumplere): integritate recipient, integritate orificii, integritate sigilii, prezența cocoloașelor și prezența particulelor.

17. Se așază etichetele aprobate pe fiecare pungă.

18. Se verifică eticheta produsului final inclusiv: număr lot, numele produsului, data de fabricare, volumul produsului, alți aditivi, temperatura de depozitare și expirare.

19. Se introduce fiecare criorecipient (cu etichetă) într-o pungă de învelire.

20. Se etanșează termic.

21. Se introduce într-o casetă rece.

22. Se repetă pentru fiecare pungă.

23. Se introduc criorecipientele etichetate în casete condiționate și se transferă în CRF.

24. Se distribuie uniform casetele în raftul din CRF.

25. Se aplică un termocuplu pe caseta centrală sau se așază o pungă martor în poziție centrală.

26. Se închide ușa CRF.

27. Când temperatura din cameră ajunge la 4°C +/- 1.5°C, se apasă Run pe software de interfață PC.

28. Se înregistrează ora și temperatura camerei la care produsul se transferă în CRF.

Procesarea probei de control al calității

1. Se transferă aseptice următoarele materiale în BSC, după caz, și se etichetează conform tabelului de mai jos.

2. Se utilizează o pipetă nouă pentru următoarele:

QC și tabel reținere

3. Furnizare în QC: 1 - tub numărare celule, 1 - tub endotoxină, 1 - tub micoplasmă, 1-tub colorație Gram, 1 tub restimulare și 1- tub curgere la QC pentru testare imediată. Restul tuburilor duplicat s-au introdus în congelatorul cu rată controlată de îngheț.

4. Se contactează supervisorul QC pentru informarea testării necesare.

5. Vezi tabelul 18 pentru instrucțiuni de testare și depozitare.

TABEL 18. instrucțiuni de testare și depozitare.

Test	Vas
Număr celule și viabilitate	Criofiola.
Micoplasma	Criofiola se depozitează la 4°C până la încheierea testării.
Sterilitate	Se inoculează 0.5 mL într-un flacon de cultură anaerob și 0.5mL în aerob.
Colorație Gram	Criofiola se depozitează la 4°C până la încheierea testării.
Endotoxina	Criofiola se depozitează la 4°C până la încheierea testării.
Flux	Criofiola se depozitează la 4°C până la încheierea testării.
Reținere post-preparare	Crioconservare pentru testare ulterioară: constă din 5 fiolele satelit, 1 - tub numărare celule, 1- tub endotoxină, 1 - tub micoplasmă, 1-tub colorație Gram și 1- tub curgere la QC pentru testare imediată.
Restimulare	Proba este furnizată la temperatura camerei și testul trebuie să înceapă în 30 de minute de la rezultatele numărării celulelor.

5

Numărare celule

Se efectuează o singură numărare a celulelor pe fiecare probă și se înregistrează data și se atașează datele de numărare brute la evidențele lotului. Se documentează programul de numărare Cellometer. Se verifică dacă s-a introdus diluarea corectă în Cellometer.

10

Crioconservarea celulelor de reținere post-preparare:

1. Se introduce fiola în CRF.
2. se deplasează la locul de depozitare după încheierea congelării și se înregistrează data și ora amplasării în CFR. Se înregistrează data și ora așezării în LN₂.

15

Testare microbiologică

1. Se comandă testarea plăcilor de sedimentare în laboratorul de microbiologie.
2. Se înregistrează numerele de referință.
3. Se comandă testarea sterilității aerobe și anaerobe.
4. Se asigură livrarea plăcilor și flacoanelor în laboratorul de microbiologie.

20

Post-crioconservarea pungilor de produs celular

1. Se oprește congelatorul după încheierea ciclului. Ciclul poate fi oprit prin apăsarea butonului Stop sau a tastei Back de pe tastatura congelatorului.
2. Se îndepărtează criorecipientele din casetă.
3. Se transferă casetele în LN₂ în fază de vapori.
4. Se înregistrează colul de depozitare.
5. Se introduc orice comentarii suplimentare la deschiderea ferestrei de introducere text. Această fereastră apare indiferent de metoda de oprire a ciclului.
6. Se imprimă raportul profilului și se atașează la evidențele lotului etichetat cu numărul de lot.
7. Se încheie Warm Mode și se închide ecranul Run cu butonul Ieșire.

25

30

EXEMPLUL 9: PROCESUL DE CRIOCONSERVARE

Acest exemplu descrie procesul de crioconservare pentru TIL preparate cu procedura abreviată descrisă mai sus în Exemplul 8 folosind congelatorul cu rată controlată de îngheț CryoMed, model 7454 (Thermo Scientific).

35

Echipamentul folosit, pe lângă cel descris în Exemplul 9, este următorul: raft de suport al casetelor de aluminiu (compatibil cu pungi CS750), casete de criodepozitare pentru pungi 750 mL, rezervor de azot lichid de joasă presiune (22 psi), frigider, sensor de termocuplu (tip flexibil pentru pungi) și pungi CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

40

Procesul de congelare asigură o rată de 0.5°C de la formarea nucleelor la -20°C și 1°C rată de congelare pe minut până la temperatura finală de -80°C. parametrii programului sunt: Etapa 1 – așteptare la 4°C; Etapa 2: 1.0°C/min (temperatura probei) până la -4°C; Etapa 3: 20.0°C/min (temperatura camerei) până la -45°C; Etapa 4: 10.0°C/min (temperatura camerei) până la -10.0°C; Etapa 5: 0.5°C/min (temperatura camerei) până la -20°C; și Etapa 6: 1.0°C/min (temperatura probei) până la -80°C.

O reprezentare a procedurii din acest exemplu în legătură cu procesul din Exemplele 1 - 8 este indicată în Figura 11.

EXEMPLUL 10: CARACTERIZAREA TIL DIN PROCESUL 2A

Acest exemplu descrie caracterizarea TIL preparate cu procedura descrisă mai sus. Pe scurt, procedura (procesul 2A, descris în Exemplele 1 - 9) a avut avantajele față de procesele anterioare de preparare TIL indicate în Tabelul 19. Avantajele Pre-REP pot include: fragmente tumorale mărite per balon, timp de cultură scurtat, număr redus de etape și/sau adaptare la sistem închis. Avantajele tranziției de la Pre-REP la REP pot include: proces pre-REP-REP scurtat, număr redus de etape, selecție de fenotipare eliminată, și/sau adaptare la sistem închis. Avantajele REP pot include: număr redus de etape, durată REP mai scurtă, transfer TIL în sistem închis între baloane, și/sau sistem închis media exchanges. Avantajele Harvest can include: număr redus de etape, spălare celulară automată, sistem închis și pierdere redusă de produs în timpul spălării. Avantajele compoziției și/sau produsului final pot include flexibilitatea transportului.

TABEL 19. Compararea procesului 1C exemplificativ și a unei aplicări a procesului 2A.

Etapă proces	Proces 1C - aplicare	Proces 2A - aplicare
Pre-REP	• 4 fragmente per 10 G-REX -10 baloane	• 40 fragmente per 1 balon G-REX -100M
	• durată 11-21 zile	• durată 11 zile
Tranziție pre-REP în REP	• TIL pre-REP sunt congelate până la fenotipare pentru selecție, apoi se decongelează pentru continuare la REP (-ziua 30)	• TIL pre-REP trec direct în REP în ziua 11
	• REP necesită >40×10 ⁶ TIL	• REP necesită 25-200×10 ⁶ TIL
REP	• 6 baloane G-REX -100M în ziua 0 REP	• 1 balon G-REX -500M în ziua 11
	• 5 × 10 ⁶ TIL și 5 × 10 ⁸ feeder PBMC per balon în ziua 0 REP	• 25-200×10 ⁶ TIL și 5×10 ⁹ feeder PBMC în ziua 11
	• Separare în 18-36 baloane în ziua 7 REP	• Separare în ≤ 6 baloane G-REX -500M în ziua 16
	• durată 14 zile	• durată 11 zile
Recoltare	• TIL recoltate prin centrifugare	• TIL recoltate prin sistem de spălare celulară automată LOVO'
Compoziție finală	• Produs proaspăt în Hypothennosol	• Produs crioconservat în PlasmaLyte-A + 1% HSA și CS10 depozitat în LN ₂
	• O singură pungă de perfuzie	• Părți alicote multiple
	• Stabilitate limitată la transport	• Stabilitate mai îndelungată la transport
Timp total estimat	• 43-55 zile	• 22 zile

S-au efectuat în total 9 experimente folosind TIL derivate din 9 tumori descrise în Tabelul 20. Toate datele indicate aici s-au măsurat din produs TIL congelat dezghețat din procesul 1C și o aplicare a procesului 2A.

TABEL 20. Descrierea donatorilor de tumori, date și locuri de procesare.

ID tumoare	Tip țesut	Sursă	Țesut
M1061	Melanom	MT group	Primar - picior stânga lateral
M1062	Melanom	Moffitt	N/A
M1063	Melanom	MT group	Metastatic C - zona inghinală dreapta
M1064	Melanom	MT group	Metastatic C - gleznă stânga
M1065	Melanom	Bio Options	Metastatic - ganglion limfatic axilar
EP11001	ER+PR+	MT group	Primar - carcinom ductal invaziv mamar stânga
M1056*	Melanom	Moffitt	N/A
M1058*	Melanom	MT group	Metastatic - scalp dreapta stadiu IIB
M1023*	Melanom	Atlantic Health	Primar - axila dreaptă

Procedurile descrise în prezenta pentru procesul 2A s-au folosit pentru a produce TIL de caracterizare în acest exemplu. Pe scurt, pentru REP, în ziua 11, s-a preparat un balon G-REX -500M conținând 5 L de CM2 suplimentat cu 3000 IU/ml rhil-2, 30ng/mL anti-CD3 (Clona OKT3) și 5×10^9 celule feeder PBMC alogenice iradiate. TIL recoltate din balonul G-REX -100M pre-REP după reducerea volumului s-au numărat și s-au însămânțat în balonul G-REX -500M la o densitate cuprinsă între 5×10^6 și 200×10^6 celule. Balonul s-a introdus într-un incubator de cultură tisulară umidificat la 37°C, 5% CO₂ timp de cinci zile. În ziua 16, s-a redus volumul balonului G-REX -500M, s-au numărat TIL și s-a determinat viabilitatea. În acest punct, TIL s-au amplificat în baloane G-REX -500M multiple (până la maxim șase baloane), fiecare cu o densitate de însămânțare de 1×10^9 TIL/balon. Toate baloanele s-au introdus în incubatoare de cultură tisulară umidificate la 37°C, 5% CO₂ alte șase zile. În ziua 22, ziua recoltării, s-a redus volumul fiecărui balon cu 90%, celulele au fost colectate și filtrate printr-un filtru sanguin de 170 μm, după care s-au colectat într-o pungă de 3 L Origin EV3000 sau echivalent în vederea spălării automate LOVO. TIL s-au spălat folosind sistemul de procesare celulară automată LOVO care a înlocuit 99.99% din mediul de cultură celulară cu un tampon de spălare constând din PlasmaLyte-A suplimentat cu 1% HSA. LOVO funcționează folosind tehnologia membranară de filtrare prin centrifugare care recuperează peste 92% din TIL, eliminând practic componentele de cultură tisulară reziduale, inclusiv ser, factori de creștere și citokine, precum și alte reziduuri și particule. După încheierea spălării, se efectuează o numărare a celulelor pentru a determina amplificarea TIL și viabilitatea acestora la recoltare. S-a adăugat CS10 în TIL spălate la un raport 1:1 volum:volum pentru a obține compoziția finală a procesului 2A. Produsul preparat final a fost împărțit în părți alicote în pungi de criodepozitare, etanșat și introdus în casete de aluminiu prerăcite. Pungile de criodepozitare conținând TIL s-au congelat folosind un congelator cu rată controlată de îngheț CryoMed (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) conform procedurilor descrise în prezenta, inclusiv în Exemplul 9.

Numărul de celule și viabilitatea procentuală pentru cele nouă probe se compară în Figurile 12 și 13.

Markerii de suprafață celulară indicați în rezultatele următoare s-au analizat prin citometrie în flux (citometru Canto II, Becton, Dickinson și Co., Franklin Lakes, NJ, USA) folosind reactivi adecvați din comerț. Rezultatele pentru markerii de interes sunt indicate în Figura 14 - Figura 23.

S-au folosit diferite metode pentru măsurarea lungimii telomerilor în ADN genomic și preparate citologice. Analiza fragmentelor de restricție telomerice (TRF) este etalonul de aur în măsurarea lungimii telomerilor (de Lange et al., 1990). Totuși, limitarea majoră a TRF este necesitatea unei cantități mari de ADN (1.5 μg). Aici s-au aplicat două tehnici larg utilizate pentru măsurarea lungimii telomerilor, și anume hibridizarea fluorescență *in situ* (FISH) și PCR cantitativă.

Flow-FISH s-a efectuat folosind kitul Dako (K532711-8 RUO Code K5327 Telomere PNA Kit/FITC pentru citometrie în flux, PNA FISH Kit/FITC. Flow, 20 teste) și s-au urmat instrucțiunile producătorului pentru a măsura lungimea medie a repetiției telomerice. Pe scurt, suprafața celulelor s-a colorat cu CD3 APC 20 minute la 4°C, urmat de GAM Alexa 546 timp de 20 minute. Complexul antigen-anticorp a fost legat încricușat cu 2 mM cross-linker chimic BS3 (Fisher Scientific). S-a folosit legarea sondei PNA-telomer într-o populație standard de celule T cu telomeri lungi, linia celulară leucemică T Jurkat 1301 (celule 1301) ca standard de referință intern în fiecare test. TIL individuale s-au numărat după incubare cu anticorp și s-au amestecat cu 1301 celule (ATCC) la un raport celular 1:1. 5×10^5 TIL s-au amestecat cu 5×10^5 celule 1301. Hibridizarea *in situ* s-a efectuat în soluție de hibridizare (70% formamidă,

1% BSA, 20mM Tris pH 7.0) în duplicat și în prezența și absența unei sonde PNA telomer conjugat cu FITC (Panagene), FITC-00-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA, complementar cu secvența repetiției telomerice la o concentrație finală de 60nM. După adăugarea sondei PNA telomer, celulele s-au incubat 10 minute la 81°C într-o baie de apă cu agitare. Celulele s-au așezat apoi la întuneric la temperatura camerei peste noapte. Dimineata următoare, s-a îndepărtat sonda de telomer în exces prin spălare de 2 ori cu PBS pre-încălzit la 40°C. După spălări, s-a adăugat DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA) la o concentrație finală de 75 ng/mL. S-a folosit colorarea ADN cu DAPI pentru activarea celulelor în populația G0/G1. Analiza probelor s-a efectuat folosind citometrul nostru (BD Canto II, Mountain View, CA). Fluorescența telomerică a probei testate s-a exprimat ca procentaj al fluorescenței (fl) celulelor 1301 conform formulei:

S-a folosit și qPCR în timp real pentru a măsura lungimea relativă a telomerilor (Nucleic Acids Res. 2002 May 15; 30(10): e47., 20, Leukemia, 2013, 27, 897-906). Pe scurt, s-a determinat raportul dintre numărul copiilor repetițiilor telomerice și numărul copiilor genice individuale (T/S) folosind un ciclu termic BioRad PCR (Hercules, CA) într-un format cu 96 de godeuri. S-au folosit zece ng de ADN genomic pentru reacția PCR a telomerilor sau hemoglobinei (hgb) și primerii utilizați au fost: primer Tel-1b (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), primer Tel-2b (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT), primer hgb1 (GCTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC) și primer hgb2 (CACCAACTTCATCCACGTTCCACC). Toate probele s-au analizat prin reacții telomerice și hemoglobinic și analiza s-a efectuat în triplicat pe aceeași placă. Pe lângă probele testate, fiecare placă cu 96 de godeuri a conținut o curbă standard în cinci puncte de la 0.08 ng la 250 ng folosind ADN genomic izolat din linia celulară 1301. Raportul T/S (-dCt) pentru fiecare probă s-a calculat scăzând valoarea ciclului prag hemoglobinic median (Ct) din valoarea Ct telomeric median. Raportul T/S relativ (-ddCt) s-a determinat scăzând raportul T/S al punctului curbei standard 10.0 ng din raportul T/S al fiecărei probe necunoscute.

Rezultatele Flow-FISH sunt indicate în Figurile 24 și 25 și nu se observă diferențe semnificative între procesul 1C și procesul 2A, sugerând că proprietățile surprinzătoare ale TIL produse prin procesul 2A nu au fost previzibile doar din vârsta TIL.

În concluzie, din procesul 2A a rezultat un produs TIL potent cu un fenotip "tânăr" definit de nivelurile mari ale moleculelor co-stimulatoare, nivelurile mici ale markerilor de epuizare și o capacitate mărită de a secreta citokine la reactivare. Platforma de expansiune de 22 de zile prescurtată permite generarea rapidă a dozelor TIL la scară clinică pentru pacienți în nevoie urgentă de terapie. Produsul medicamentos crioconservat determină eficiențe logistice esențiale, care permit fabricarea rapidă și flexibilitatea distribuției. Această metodă de expansiune depășește barierele tradiționale în aplicarea mai largă a terapiei TIL.

EXEMPLUL 11: UTILIZAREA AMESTECULUI DE CITOKINE IL-2, IL-15 și IL-21

Acest exemplu descrie utilizarea citokinelor IL-2, IL-15 și IL-21, care au rol de factori de creștere T celulari suplimentari, în combinație cu procesul TIL din Exemplele 1 - 10.

Folosind procesul din Exemplele 1 - 10, TIL au fost crescute din tumori colorectale, melanom, de col uterin, mamare triplu negative, pulmonare și renale în prezența IL-2 într-o ramificație a experimentului și, în locul IL-2, a unei combinații de IL-2, IL-15 și IL-21 într-o altă ramificație a inițierii culturii. La încheierea pre-REP, culturile s-au evaluat cu privire la amplificarea, fenotip, funcție (CD107a+ și IFN-γ) și repertoriu TCR Vβ. IL-15 și IL-21 se descriu în altă parte în prezenta și în Grujil, et al., IL-21 susține amplificarea limfocitelor infiltrante în tumori CD27+CD28+ cu potențial citotoxic mare și expansiune colaterală mică a celulelor T reglatoare, Santegoets, S. J., J Transl Med., 2013, 11:37 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/>).

Rezultatele au arătat că s-a observat expansiune TIL mărită (>20%) în celule CD4+ și CD8+ în condiții tratate cu IL-2, IL-15 și IL-21 în histologii multiple față de condițiile numai cu IL-2. A existat o predilecție către o populație predominant CD8+ cu un repertoriu predilect TCR Vβ în TIL obținute din culturile tratate cu IL-2, IL-15 și IL-21 față de culturile numai cu IL-2. IFN-γ și CD107a au fost mărite în TIL tratate cu IL-2, IL-15 și IL-21 în comparație cu TIL tratate numai cu IL-2.

EXEMPLUL 12: STUDIUL ÎN MELANOM FAZA 2, ÎN CENTRE MULTIPLE, CU TREI GRUPURI

Acest studiu faza 2, în centre multiple, cu trei grupuri este prevăzut pentru a evalua siguranța și eficiența unei terapii cu TIL preparate conform procesului 1C (descriș în prezenta) la pacienți cu melanom metastatic. Grupurile 1 și 2 vor include până la câte 30 de pacienți și grupul 3 este un grup de re-tratament pentru o a doua perfuzie TIL la până la zece pacienți. primele două grupuri evaluează două procese de preparare diferite: procesul 1C și o aplicare a procesului 2A (descriș în Exemplele 1 - 10). Pacienții din primul grup primesc TIL proaspete, non-crioconservate, iar pacienții din al doilea grup primesc produs preparat prin procesul descriș în Exemplele 1 - 10, din care rezultă un produs crioconservat. Modelul studiului este indicat în FIG. 26. Studiul este un studiu faza 2, în centre multiple, cu trei grupuri de evaluare

a siguranței și eficienței TIL autologe pentru tratarea subpopulațiilor de pacienți cu melanom metastatic. Principalele criterii de includere sunt: melanom metastatic măsurabil și ≥ 1 leziune rezercabilă pentru generare TIL; cel puțin o linie anterioară de terapie sistemică; vârsta ≥ 18 ; și stadiu performanță ECOG 0-1. Grupurile de tratament includ produs TIL necrioconservat (preparat folosind procesul 1C), produs TIL crioconservat (preparat folosind o aplicare a procesului 2A) și retratament cu produs TIL pentru pacienți fără răspuns sau cu avansare după răspunsul inițial. Obiectivul primar este siguranța și obiectivul secundar este eficiența, definită ca rată de răspuns obiectiv (ORR), rată de remisiune completă (CRR), supraviețuire fără avansare (PFS), durata răspunsului (DOR) și supraviețuirea totală (OS).

EXEMPLUL 13: CALIFICAREA LOTURILOR INDIVIDUALE DE CELULE MONONUCLEARE PERIFERICE GAMMA-IRADIATE

Acest exemplu descrie o nouă procedură scurtată pentru calificarea loturilor individuale de celule mononucleare periferice gamma-iradiate (PBMC, cunoscute și ca MNC) pentru utilizare ca celule feeder alogene în metodele exemplificative descrise în prezenta.

Fiecare lot de MNC feeder iradiate s-a preparat de la un donator individual. Fiecare lot sau donator s-a analizat individual cu privire la capacitatea de a amplifica TIL în REP în prezența anticorpului anti-CD3 purificat (clona OKT3) și interleukinei-2 (IL-2). În plus, fiecare lot de celule feeder s-a testat fără adăugarea TIL pentru a verifica dacă doza primită de radiație gamma a fost suficientă pentru a le face incompetente de replicare.

Definiții/abrevieri

BSC - Cabinet de biosecuritate
 CD3 - Grup de diferențiere 3; limfocite T proteine markeri suprafață
 CF - Centrifug
 CM2 - Mediu complet pentru TIL #
 CMO - Organizație de fabricare contractuală
 CO₂ - Dioxid de carbon
 EtOH - Alcool etilic
 GMP - Bună practică de producție
 IL-2 - Interleukina 2
 IU - Unități internaționale
 LN2 - Azot lichid
 mini-REP - Mini-protocol de expansiune rapidă
 ml - Mililitru
 MNC - Celule mononucleare
 NA - Inaplicabil
 OKT3 - anticorp MACS GMP CD3 pur (clona OKT3)
 PPE - Echipament personal de protecție
 Pre-REP - Pre-protocol de expansiune rapidă
 QS - Quantum Satis; completare până la această cantitate
 REP - Protocol de expansiune rapidă
 TIL - Limfocite infiltrante în tumori
 T25 - Balon de cultură tisulară de 25cm²
 μg - Micrograme
 μL - Microlitru

PROCEDURĂ

Bază

7.1.1 Celulele feeder MNC gamma-iradiate, cu creștere oprită, au fost necesare pentru REP TIL. Receptorii membranari pe MNC feeder se leagă de anticorp anti-CD3 (clona OKT3) și se leagă încrucișat de TIL în balonul REP, stimulând amplificarea TIL. Loturile feeder s-au preparat din leucafereza sângelui integral prelevat de la donatori individuali. Produsul de leucafereză a fost supus centrifugării în Ficoll-Hypaque, spălat, iradiat și crioconservat în condiții GMP.

7.1.2 Este important ca pacienții care au primit terapie TIL să nu primească perfuzie cu celule feeder viabile fiindcă aceasta poate provoca boala grefă contra gazdă (GVHD). Celulele feeder sunt oprite din creștere prin dozarea celulelor cu radiație gamma, ducând la rupturi ADN dublu catenare și pierderea viabilității celulelor MNC la recultivare.

Criterii de evaluare și organizare experimentală

Loturile feeder s-au evaluat cu privire la două criterii: 1) capacitatea de a amplifica TIL în co-cultură >100 ori și 2) incompetența de replicare.

- 5 7.2.2 Loturile feeder au fost testate în format mini-REP folosind două linii TIL pre-REP primare crescute în baloane de cultură tisulară T25 verticale.
- 7.2.3 Loturile feeder au fost testate față de două linii TIL distincte, fiecare linie TIL fiind unică în capacitatea de proliferare în răspuns la activare în REP.
- 7.2.4 Ca un control, s-a folosit un lot de celule feeder MNC iradiate dovedite istoric că îndeplinesc criteriile de la 7.2.1 pe lângă loturile testate.
- 10 7.2.5 Pentru a asigura că toate loturile testate într-un singur experiment sunt testate echivalent, au fost disponibile suficiente stocuri de linii TIL pre-REP identice pentru a testa toate condițiile și toate loturile feeder.
- 7.2.6 Pentru fiecare lot de celule feeder testate, au fost în total șase baloane T25:
- 15 7.2.6.1 Linia TIL pre-REP #1 (2 baloane)
- 7.2.6.2 Linia TIL pre-REP #2 (2 baloane)
- 7.2.6.3 Control feeder (2 baloane)

- 20 NOTĂ: baloanele conținând liniile TIL #1 și #2 au evaluat capacitatea lotului feeder de a amplifica TIL. Baloanele de control feeder au evaluat incompetența de replicare a lotului feeder.

Protocol experimental

- 7.3.1 Ziua -2/3, decongelarea liniilor TIL
- 7.3.1.1 Se prepară mediu CM2.
- 25 7.3.1.2 Se încălzește CM2 în baie de apă 37°C.
- 7.3.1.3 Se prepară 40 ml de CM2 suplimentat cu 3000IU/ml IL-2. Se păstrează cald până la utilizare.
- 7.3.1.4 Se introduc 20 ml de CM2 preîncălzit fără IL-2 în fiecare din cele două tuburi conice de 50ml etichetate cu numele liniilor TIL folosite.
- 30 7.3.1.5 Se îndepărtează cele două linii TIL pre-REP desemnate din depozitare LN2 și se transferă fiolele în camera de cultură tisulară.
- 7.3.1.6 Se înregistrează identificarea liniei TIL.
- 7.3.1.7 Se decongelează fiolele prin amplasare într-o pungă de depozitare sigilată într-o baie de apă 37°C până când rămâne o cantitate mică de gheață.
- 7.3.1.8 Se pulverizează sau se șterg fiolele decongelate cu 70% etanol și se transferă fiolele în BSC.
- 35 7.3.1.9 Folosind o pipetă de transfer sterilă, se transferă imediat conținutul fiolei în 20ml de CM2 în tubul conic de 50ml etichetat.
- 7.3.1.10 QS până la 40ml folosind CM2 fără IL-2 pentru spălarea celulelor.
- 7.3.1.11 Se centrifughează la 400 x CF 5 minute.
- 40 7.3.1.12 Se aspiră supernatantul și se resuspendă în 5ml CM2 cald suplimentat cu 3000 IU/ml IL-2.
- 7.3.1.13 Se îndepărtează o parte alicotă mică (20μl) în duplicat pentru numărarea celulelor folosind un aparat automat. Se înregistrează numărul.
- 7.3.1.14 În timpul numărării, se introduce tubul conic de 50ml cu celule TIL într-un incubator umidificat la 37°C, 5% CO₂, cu capacul desfăcut pentru a permite schimb de gaz.
- 45 7.3.1.15 Se determină concentrația celulară și se diluează TIL la 1×10^6 celule/mL în CM2 suplimentat cu IL-2 la 3000 IU/ml.
- 7.3.1.16 Se cultivă în 2ml/godeu al unei plăci de cultură tisulară cu 24 de godeuri în atâtea godeuri cât sunt necesare într-un incubator umidificat la 37°C până în ziua 0 a mini-REP.
- 7.3.1.17 Se cultivă liniile TIL diferite în plăci de cultură tisulară cu 24 de godeuri separate pentru a evita confuzia și posibila contaminare.
- 50 7.3.2 Ziua 0, inițiere mini-REP
- 7.3.2.1 Se prepară suficient mediu CM2 pentru numărul loturilor feeder testate (de ex., pentru testarea a 4 loturi feeder o dată, se prepară 800ml de mediu CM2).
- 7.3.2.2 Se împarte în părți alicote o porțiune a CM2 preparat la 7.3.2.1 și se suplimentează cu 3000 IU/ml IL-2 pentru cultivarea celulelor. (de ex., pentru testarea a 4 loturi feeder o dată, se prepară 500ml de mediu CM2 cu 3000 IU/ml IL-2).
- 55 7.3.2.3 Restul CM2 fără IL-2 se va folosi pentru spălarea celulelor așa cum se descrie mai jos.
- 7.3.2.4 Lucrând cu fiecare linie TIL separat pentru a preveni contaminarea, se îndepărtează placa cu 24 de godeuri cu cultură TIL din incubator și se transferă în BSC.

7.3.2.5 Folosind o pipetă de transfer sterilă sau Pipettor de 100-1000μl, se îndepărtează circa 1ml de mediu din fiecare godeu TIL folosit și se așază într-un godeu neutilizat al plăcii de cultură tisulară cu 24 de godeuri. Acesta se folosește pentru spălarea godeurilor.

5 7.3.2.6 Folosind o pipetă de transfer sterilă nouă sau Pipettor de 100-1000μl, se amestecă restul mediului cu TIL în godeuri pentru a resuspenda celulele, după care se transferă suspensia celulară într-un tub conic de 50ml etichetat cu numele TIL și se înregistrează volumul.

7.3.2.7 Se spală godeurile cu mediul rezervat și se transferă acel volum în același tub conic de 50ml.

7.3.2.8 Se centrifughează celulele la 400 x CF pentru colectarea peletului celular.

10 7.3.2.9 Se aspiră supernatantul și se resuspendă peletul celular în 2-5ml de mediu CM2 containing 3000 IU/ml IL-2, volum folosit pe baza numărului de godeuri recoltate și a dimensiunii peletului - volumul ar trebui să fie suficient pentru a asigura o concentrație de $>1.3 \times 10^6$ celule/mL.

7.3.2.10 Folosind o pipetă serologică, se amestecă bine suspensia celulară și se înregistrează volumul.

7.3.2.11 Se îndepărtează 200μl pentru numărarea celulelor cu un aparat automat.

15 7.3.2.12 În timpul numărării, se introduce tubul conic de 50ml cu celule TIL într-un incubator umidificat, 5% CO₂, 37°C, cu capacul desfăcut pentru a permite schimb de gaz.

7.3.2.13 Se înregistrează numărul.

7.3.2.14 Se îndepărtează tubul conic de 50ml conținând celulele TIL din incubator și se resuspendă celulele la o concentrație de 1.3×10^6 celule/mL în CM2 cald suplimentat cu 3000IU/ml IL-2. Se reintroduce tubul conic de 50ml în incubator cu capac desfăcut.

20 7.3.2.15 Dacă se dorește, se păstrează placa inițială cu 24 de godeuri pentru recultivarea TIL reziduale.

7.3.2.16 Se repetă etapele 7.3.2.4 - 7.3.2.15 pentru a doua linie TIL.

7.3.2.17 Chiar înainte de așezarea TIL în baloanele T25 pentru experiment, TIL s-au diluat la 1:10 pentru o concentrație finală de 1.3×10^5 celule/mL conform etapei 7.3.2.35 de mai jos.

25 **Prepararea soluției de lucru MACS GMP CD3 pur (OKT3)**

7.3.2.18 Se extrage soluție de bază de OKT3 (1mg/ml) din frigider la 4°C și se introduce în BSC.

7.3.2.19 Se utilizează o concentrație finală de 30ng/ml OKT3 în mediul mini-REP.

30 7.3.2.20 Au fost necesare 600ng de OKT3 pentru 20ml în fiecare balon T25 al experimentului; acestea au fost echivalentul a 60μl dintr-o soluție 10μg/ml pentru fiecare 20ml sau 360μl pentru toate cele 6 baloane testate pentru fiecare lot feeder.

7.3.2.21 Pentru fiecare lot feeder testat, se prepară 400μl dintr-o diluare 1:100 a 1mg/ml OKT3 pentru o concentrație de lucru de 10μg/ml (de ex., pentru testarea a 4 loturi feeder o dată, se prepară 1600μl dintr-o diluare 1:100 a 1mg/ml OKT3: 16μl de 1mg/ml OKT3 + 1.584ml de mediu CM2 cu 3000IU/ml IL-2.)

35 **Prepararea baloanelor T25**

7.3.2.22 Se etichetează fiecare balon cu numele liniei TIL testate, numărul de replicare al balonului, numărul lotului feeder, data și inițialele analistului.

7.3.2.23 Se umple balonul cu mediul CM2 înainte de prepararea celulelor feeder.

40 7.3.2.24 Se introduc baloanele în incubatorul umidificat la 37°C, 5% CO₂ pentru a menține mediul cald în așteptarea adăugării restului componentelor.

7.3.2.25 După prepararea celulelor feeder, componentele se vor adăuga în CM2 în fiecare balon.

Prepararea soluției de lucru MACS GMP CD3 pur (OKT3).

45

TABEL 21: Soluții

Componentă	Volum în baloane de co-cultură	Volum în baloane de control (doar feeder)
CM2 + 3000 IU/ml IL-2:	18ml	19ml
MNC: 1.3×10^7 /ml în CM2 + 3000IU IL-2 (concentrație finală 1.3×10^7 /balon)	1ml	1ml
OKT3: 10μg/ml în CM2 + 3000 IU IL-2	60μl	60μl
TIL: 1.3×10^5 /ml în CM2 cu 3000IU IL-2 (concentrație finală 1.3×10^5 /balon)	1ml	0

Prepararea celulelor feeder

- 7.3.2.26 Au fost necesare minim 78×10^6 celule feeder per lot testat pentru acest protocol. Fiecare fiolă de 1ml congelată prin SDBB a avut 100×10^6 celule viabile la congelare. Presupunând o recuperare de 50% la decongelare din depozitare LN2, s-a recomandat decongelarea a cel puțin două fiole de 1ml de celule feeder per lot, obținând estimativ 100×10^6 celule viabile pentru fiecare REP. Alternativ, dacă s-au furnizat în fiole de 1.8ml, o singură fiolă a asigurat suficiente celule feeder.
- 7.3.2.27 Înaintea decongelării celulelor feeder, se preîncălzește aproximativ 50ml de CM2 fără IL-2 pentru fiecare lot feeder testat.
- 7.3.2.28 Se îndepărtează fiolele desemnate de lot feeder din depozitarea LN2, se introduc în punga de depozitare și se așază pe gheață. Se transferă fiolele în camera de cultură tisulară.
- 7.3.2.29 Se decongelează fiolele în punga de depozitare închisă prin scufundare într-o baie de apă 37°C.
- 7.3.2.30 Se îndepărtează fiolele din pungă, se pulverizează sau se șterg cu 70% EtOH și se transferă în BSC.
- 7.3.2.31 Folosind o pipetă de transfer, se transferă imediat conținutul fiolelor feeder în 30ml CM2 cald într-un tub conic de 50ml. Se spală fiola cu volum mic de CM2 pentru îndepărtarea celulelor reziduale.
- 7.3.2.32 Se centrifughează la $400 \times CF$ 5 minute.
- 7.3.2.33 Se aspiră supernatantul și se resuspendă în 4ml CM2 cald plus 3000 IU/ml IL-2.
- 7.3.2.34 Se îndepărtează 200 μ l pentru numărarea celulelor folosind Automated Cell Counter. Se înregistrează numărul.
- 7.3.2.34 Se resuspendă celulele la 1.3×10^7 celule/mL în CM2 cald plus 3000 IU/ml IL-2.
- 7.3.2.34 Se diluează celulele TIL din 1.3×10^6 celule/mL în 1.3×10^5 celule/mL. Se lucrează cu fiecare linie TIL independent pentru a preveni contaminarea.

Organizarea co-culturii

- 7.3.2.36 Se diluează celulele TIL de la 1.3×10^6 celule/mL la 1.3×10^5 celule/mL. Se lucrează cu fiecare linie TIL independent pentru a preveni contaminarea.
- 7.3.2.36.1 Se adaugă 4.5ml de mediu CM2 într-un tub conic de 15ml.
- 7.3.2.36.2 Se îndepărtează celule TIL din incubator și se resuspendă godeul folosind o pipetă serologică de 10ml.
- 7.3.2.36.3 Se îndepărtează 0.5ml de celule din suspensia TIL de 1.3×10^6 celule/mL și se adaugă în 4.5ml de mediu în tubul conic de 15ml. Se reintroduce fiola TIL în incubator.
- 7.3.2.36.4 Se amestecă bine.
- 7.3.2.36.5 Se repetă etapele 7.3.2.36.1 - 7.3.2.36.4 pentru a doua linie TIL.
- 7.3.2.36.6 Dacă se testează mai mult de un lot feeder o dată, se diluează TIL în concentrație mai mică pentru fiecare lot feeder chiar înainte de așezarea TIL în placă.
- 7.3.2.37 Se transferă baloane cu mediu preîncălzit pentru un singur lot feeder din incubator în BSC.
- 7.3.2.38 Se amestecă celulele feeder prin extragere și reintroducere cu pipeta cu vârf de 1ml de câteva ori și se transferă 1 ml (1.3×10^7 celule) în fiecare balon pentru acel lot feeder.
- 7.3.2.39 Se adaugă 60 μ l de soluție de lucru OKT3 (10 μ g/ml) în fiecare balon.
- 7.3.2.40 Se reintroduc cele două baloane de control în incubator.
- 7.3.2.41 Se transferă 1 ml (1.3×10^5) din fiecare lot TIL în balonul T25 etichetat corespunzător.
- 7.3.2.42 Se reintroduc baloanele în incubator și se incubează vertical. Nu se deranjează până în ziua 5.
- 7.3.2.43 Se repetă 7.3.2.36 - 7.3.2.42 pentru toate loturile feeder testate.

Ziua 5, schimbarea mediului

- 7.3.3.1 Se prepară CM2 cu 3000 IU/ml IL-2. Sunt necesari 10ml pentru fiecare balon.
- 7.3.3.2 Pentru a preveni contaminarea, se manipulează baloanele pentru un singur lot feeder o dată. Se îndepărtează baloanele din incubator și se transferă în BSC, atent pentru a nu perturba stratul celular de pe fundul balonului.
- 7.3.3.3 Se repetă pentru toate baloanele, inclusiv balonul de control.
- 7.3.3.4 Cu o pipetă de 10ml, se transferă 10ml CM2 cald cu 3000 IU/ml IL-2 în fiecare balon.
- 7.3.3.5 Se reintroduc baloanele în incubator și se incubează vertical până în ziua 7. Se repetă 7.3.3.1 - 7.3.3.6 pentru toate loturile feeder testate.

Ziua 7, recoltare

- 7.3.4.1 Pentru a preveni contaminarea, se manipulează baloanele pentru un singur lot feeder o dată.
- 7.3.4.2 Se îndepărtează baloanele din incubator și se transferă în BSC, atent pentru a nu perturba stratul celular de pe fundul balonului.

7.3.4.3 Fără a perturba celulele care cresc pe fundul baloanelor, se îndepărtează 10ml de mediu din fiecare balon de testare și 15ml de mediu din fiecare dintre baloanele de control.

7.3.4.4 Folosind o pipetă serologică de 10 ml, se resuspendă celulele în mediul rămas și se amestecă bine pentru spargerea cocloșelor.

5 7.3.4.5 Se înregistrează volumele pentru fiecare balon.

7.3.4.6 După amestecarea suspensiei celulare prin pipetare, se îndepărtează 200 μ l pentru numărare.

7.3.4.7 Se numără TIL folosind procedura operațională standard împreună cu un echipament de numărare automat.

7.3.4.8 Se înregistrează numărul în ziua 7.

10 7.3.4.9 Se repetă 7.3.4.1 - 7.3.4.8 pentru toate loturile feeder testate.

7.3.4.10 Baloanele de control feeder au fost evaluate cu privire la incompetența de replicare și baloanele conținând TIL au fost evaluate cu privire la gradul de amplificare din ziua 0 conform criteriilor indicate în Tabelul 21 (mai jos).

Ziua 7, continuarea baloanelor de control feeder în ziua 14

15

7.3.5.1 După încheierea numărării în ziua 7 a baloanelor de control feeder, se adaugă 15ml de mediu CM2 proaspăt conținând 3000 IU/ml IL-2 în fiecare dintre baloanele de control.

7.3.5.2 Se reintroduc baloanele de control în incubator și se incubează în poziție verticală până în ziua 14.

Ziua 14, nepliferare extinsă a baloanelor de control feeder

20

7.3.6.1 Pentru a preveni contaminarea, se manipulează baloanele pentru un singur lot feeder o dată.

7.3.6.2 Se îndepărtează baloanele din incubator și se transferă în BSC, atent pentru a nu perturba stratul celular de pe fundul balonului.

25

7.3.6.3 Fără a perturba celulele care cresc pe fundul baloanelor, se îndepărtează aproximativ 17ml de mediu din fiecare balon de control.

7.3.6.4 Folosind o pipetă serologică de 5 ml, se resuspendă celulele în mediul rămas și se amestecă bine pentru spargerea cocloșelor.

7.3.6.5 Se înregistrează volumele pentru fiecare balon.

7.3.6.6 După amestecarea suspensiei celulare prin pipetare, se îndepărtează 200 μ l pentru numărare.

30

7.3.6.7 Se numără TIL folosind procedura operațională standard împreună cu un echipament de numărare automat.

7.3.6.8 Se înregistrează numărul.

7.3.6.9 Se repetă 7.3.4.1 - 7.3.4.8 pentru toate loturile feeder testate.

35

REZULTATE ȘI CRITERII DE APROBARE

Rezultate

10.1.1 Doza de radiație gamma a fost suficientă pentru a face celulele feeder incompetente de replicare. S-a estimat că toate loturile îndeplinesc criteriile de evaluare și au demonstrat de asemenea o

40

reducere a numărului viabil total al celulelor feeder rămase în ziua 7 a culturii REP comparativ cu ziua 0. 10.1.2 S-a estimat că toate loturile feeder îndeplinesc criteriile de evaluare ale expansiunii de 100 de ori a creșterii TIL în ziua 7 a culturii REP.

10.1.3 S-a estimat că numărarea din ziua 14 a baloanelor de control feeder continuă tendința nepliferativă observată în ziua 7.

45

Criterii de aprobare

10.2.1 S-au îndeplinit următoarele criterii de aprobare pentru fiecare linie TIL replicată testată pentru fiecare lot de celule feeder

10.2.2 Au existat două niveluri de aprobare, după cum urmează (indicate în tabelul de mai jos).

50

TABEL 22: Criterii de aprobare

Test	Criterii de aprobare
Iradierea MNC/Incompetența de replicare	Fără creștere observată la 7 și 14 zile
Expansiunea TIL	O expansiune de cel puțin 100 de ori a fiecărei TIL (minim 1.3×10^7 celule viabile)

10.2.2.1 S-a evaluat dacă doza de radiație a fost suficientă pentru a face celulele feeder incompetente la replicare la cultivare în prezența a 30ng/ml anticorp OKT3 și 3000 IU/ml IL-2.

10.2.2.1.1 Incompetența de replicare a fost evaluată prin numărul total al celulelor viabile (TVC) determinat prin numărarea automată a celulelor în ziua 7 și ziua 14 a REP.

5 10.2.2.1.2 Criteriile de aprobare au fost "Fără creștere", ceea ce înseamnă că numărul total al celulelor viabile nu a crescut în ziua 7 și ziua 14 față de numărul celulelor viabile inițiale cultivate în ziua 0 a REP.

10.2.2.2 Se evaluează capacitatea celulelor feeder de a susține expansiunea TIL.

10.2.2.2.1 Creșterea TIL s-a măsurat cu privire la gradul de expansiune a celulelor viabile de la debutul culturii în ziua 0 a REP până în ziua 7 a REP.

10 10.2.2.2.1 În ziua 7, culturile TIL au obținut un minim de 100 de ori expansiune, (i.e., mai mult de 100 de ori numărul total al celulelor viabile TIL cultivate în ziua 0 REP), evaluat prin numărarea automată a celulelor.

10.2.2.3 Dacă un lot nu îndeplinește cele două criterii de mai sus, lotul este retestat conform planului de intervenție indicat în secțiunea 10.3 de mai jos.

15 10.2.2.4 În urma retestării unui lot nereușit, lotul feeder MNC care nu a îndeplinit cele două criterii de aprobare în evaluarea inițială și a doua testare a fost exclus.

10.2.2.5 Toate loturile feeder MNC care îndeplinesc criteriile de aprobare, dar care s-au considerat ca având performanță slabă privind capacitatea de amplificarea TIL față de alte loturi feeder anterioare testate în paralel cu aceeași linie TIL pre-REP au fost excluse.

20 Testarea secundară a loturilor feeder MNC care nu îndeplinesc criteriile de aprobare

10.3.1 În cazul în care un lot feeder MNC nu a îndeplinit nici unul dintre criteriile de aprobare indicate în secțiunea 10.2 de mai sus, se vor efectua următoarele etape de retestare a lotului pentru excluderea erorii experimentale ca o posibilă cauză.

25 10.3.2 Dacă sunt două sau mai multe fiole de testare satelit rămase din lot, lotul se retestează. Dacă rămâne o singură fiolă de testare satelit sau nici una, lotul nu a trecut de criteriile de aprobare indicate în secțiunea 10.2 de mai sus.

10.3.3 Doi operatori calificați, inclusiv persoana inițială care a evaluat lotul respectiv, testează lotul simultan.

10.3.4 Se repetă secțiunea 7.2 - 7.3 pentru re-evaluarea lotului în cauză.

30 10.3.5 Fiecare persoană testează lotul în cauză, precum și un lot de control (definit în secțiunea 7.2.4 de mai sus).

10.3.6 Pentru calificare, lotul în cauză și lotul de control trebuie să îndeplinească criteriile de aprobare de la secțiunea 10.2 la ambele persoane care efectuează testarea secundară.

35 10.3.7 La îndeplinirea acestor criterii, lotul se eliberează pentru utilizare CMO conform secțiunii 10.2 de mai sus.

EXEMPLUL 14: CALIFICAREA LOTURILOR INDIVIDUALE DE CELULE MONONUCLEARE DIN SÂNGELE PERIFERIC GAMMA-IRADIATE

Acest exemplu descrie o nouă procedură scurtată pentru calificarea loturilor individuale de celule mononucleare din sângele periferic (PBMC) gamma-iradiate utilizabile ca celule feeder alogene în metodele exemplificative descrise în prezenta. Acest exemplu prevede un protocol de evaluare a loturilor de celule PBMC iradiate pentru utilizare în producerea loturilor clinice de TIL. Fiecare lot de PBMC iradiate s-a preparat de la un donator individual. În peste 100 de protocoale de calificare, s-a arătat că, în toate cazurile, loturile PBMC iradiate de la SDBB (San Diego Blood Bank) amplifică TIL >100 de ori în ziua 7 a REP. Acest protocol de calificare modificat a fost prevăzut să se aplice pe loturi PBMC iradiate de la donatori din SDBB, care au fost testate în continuare pentru a verifica dacă doza primită de radiație gamma a fost suficientă pentru a le face incompetente la replicare. După ce s-a demonstrat că își mențin incompetența de replicare pe durata a 14 zile, loturile PBMC de la donatori s-au considerat "calificate" pentru utilizare în producerea loturilor clinice de TIL.

Termeni principali și definiții

50 μg - Microgram
 μl - Microlitru
 AIM-V - mediu de cultură celulară din comerț
 BSC - Grup de diferențiere
 55 CD - Mediu complet pentru TIL #2
 CM2 - CM2 suplimentat cu 3000 IU/ml IL-2
 CM2IL2 - Organizație de fabricare contractată
 CO₂ - Dioxid de carbon
 EtOH - Etanol

GMP - Bune practici de producție
 Gy - Gri
 IL - Interleukina
 IU - Unități internaționale
 5 LN2 - Azot lichid
 MI - Mililitru
 NA - Inaplicabil
 OKT3 - Denumire anticorp monoclonal anti-CD3
 P20 - pipetă 2-20μl
 10 P200 - pipetă 20-200μl pipettor
 PBMC - celule mononucleare din sângele periferic
 P1000 - pipetă 100-1000μl
 PPE - Echipament personal de protecție
 REP - Protocol de expansiune rapidă
 15 SDBB - San Diego Blood Bank
 TIL - Limfocite infiltrante în tumori
 T25 - balon de cultură tisulară de 25cm2
 x g - măsură a forței centrifuge relative

20 Specimenele includ PBMC de la donatori iradiate (SDBB).

Procedură

Bază

7.1.1 PBMC gamma-iradiate, cu creștere oprită, au fost necesare pentru REP actual standard TIL. Receptorii membranari de pe PBMC se leagă de anticorp anti-CD3 (clona OKT3) și se leagă încrucișat
 25 de TIL în cultură, stimulând amplificarea TIL. Loturile PBMC s-au preparat din leucafereza sângelui integral prelevat de la donatori individuali. Produsul de leucafereză a fost supus centrifugării în Ficoll-Hypaque, spălat, iradiat și crioconservat în condiții GMP.

Este important ca pacienții care au primit terapie TIL să nu primească perfuzie cu PBMC viabile fiindcă aceasta poate provoca boala greafă contra gazdă (GVHD). PBMC de la donatori sunt oprite din creștere prin
 30 dozarea celulelor cu radiație gamma, ducând la rupturi ADN dublu catenare și pierderea viabilității celulelor PBMC la recultivare.

Criterii de evaluare

7.2.1 Criteriul de evaluare pentru loturile PBMC iradiate a fost incompetența de replicare.

Organizare experimentală

35 7.3.1 Loturile feeder au fost testate în format mini-REP ca și cum ar fi co-cultivate cu TIL, folosind baloane de cultură tisulară T25 verticale.

7.3.1.1 Lot de control: un lot de PBMC iradiate, dovedite istoric că îndeplinesc criteriul de la 7.2.1, s-a folosit împreună cu loturile experimentale ca un control.

40 7.3.2 Pentru fiecare dintre PBMC de la donatori iradiate testate, s-au folosit baloane în duplicat.

Protocol experimental

Întreaga activitate de cultură tisulară din acest protocol s-a desfășurat folosind tehnica sterilă în BSC.

Ziua 0

45 7.4.1 Se prepară ~90ml de mediu CM2 pentru fiecare lot de PBMC de la donatori testat. Se menține CM2 cald în baie de apă 37°C.

7.4.2 Se decongelează o parte alicotă de 6×10^6 IU/ml IL-2.

7.4.3 Se reintroduce mediul CM2 în BSC, se șterge cu 70% EtOH înainte de așezare în capac. Pentru fiecare lot de PBMC testat, se îndepărtează circa 60ml de CM2 într-un flacon steril separat. Se adaugă IL-2 din soluția de bază 6×10^6 IU/ml decongelată în acest mediu pentru o concentrație finală de 3000 IU/ml. Se
 50 etichetează flaconul "CM2/IL2" (sau similar) pentru a-l distinge de CM2 nesuplimentat.

7.4.4 Se etichetează două baloane T25 pentru fiecare lot de PBMC testat. Etcheta minimă include:

7.4.4.1 Număr lot

7.4.4.2 Număr balon (1 sau 2)

7.4.4.3 Data inițierii culturii (ziua 0)

55 **Preparare OKT3**

7.4.5 Se îndepărtează soluția de anti-CD3 (OKT3) din frigider la 4°C și se introduce în BSC.

7.4.6 Se folosește o concentrație finală de 30ng/ml OKT3 în mediul mini-REP.

7.4.7 Se prepară o soluție de lucru 10μg/ml de anti-CD3 (OKT3) din 1mg/ml soluție e bază. Se introduce în frigider până la utilizare.

7.4.7.1 Pentru fiecare lot PBMC testat, se prepară 150µl dintr-o diluare 1:100 de soluție anti-CD3 (OKT3). De ex., pentru testarea a 4 loturi PBMC simultan, se prepară 600µl de 10µg/ml anti-CD3 (OKT3) adăugând 6µl de soluție 1mg/ml în 594µl de CM2 suplimentat cu 3000 IU/ml IL-2.

Prepararea baloanelor

- 5 7.4.8 Se adaugă 19ml per balon de CM2/IL-2 în baloane T25 etichetate și se introduc baloanele în incubator umidificat 37°C, 5% CO₂ în timpul preparării celulelor.

Prepararea PBMC iradiate

- 10 7.4.9 Se licrează cu fiecare lot PBMC de la donatori individual pentru a evita posibila contaminare între loturi.

7.4.10 Se recuperează fiolele de loturi PBMC testate din depozitare LN2. S-au așezat la -80°C sau se mențin pe gheață uscată înainte de decongelare.

- 15 7.4.11 Se introduc 30ml CM2 (fără supliment IL-2) în tuburi conice de 50ml pentru fiecare lot decongelat. Se etichetează fiecare tub cu diferitele numere de lot PBMC decongelat. Se astupă tuburile etanș și se introduc în baie de apă 37°C înaintea utilizării. După necesitate, se reintroduc tuburile conice de 50ml în BSC, se șterg cu 70% EtOH înainte de așezare pe capac.

7.4.12 Se îndepărtează o fiolă PBMC din depozitarea la rece și se așază pe un suport flotant într-o baie de apă 37°C pentru decongelare. Se lasă să se dezghețe până rămâne o cantitate mică de gheață în fiolă.

7.4.13 Se pulverizează sau se șterge fiola decongelată cu 70% EtOH și se transferă în BSC.

- 20 7.4.14 Folosind o pipetă de transfer sterilă, se transferă imediat conținutul fiolei în 30ml CM2 în tubul conic de 50ml. Se îndepărtează circa 1ml de mediu din tub pentru clătirea fiolei; se reintroduce fluidul de clătire în tubul conic de 50ml. Se închide etanș și se agită ușor pentru spălarea celulelor.

7.4.15 Se centrifughează la 400 x g 5min la temperatura camerei.

- 25 7.4.16 Se aspiră supernatant și se resuspendă peletul celular în 1ml CM2 cald/IL-2 folosind o pipetă de 1000µl. Alternativ, înainte de adăugarea mediului, se resuspendă peletul celular prin tragerea tubului închis de-a lungul unui suport gol. După resuspendarea peletului celular, se aduce volumul la 4ml folosind mediu CM2/IL-2. Se înregistrează volumul.

7.4.17 Se îndepărtează o parte alicotă mică (de ex., 100µl) pentru numărarea celulelor folosind un aparat automat.

- 30 7.4.17.1 Se efectuează numărări în duplicat conform SOP al aparatului specific. cel mai probabil este necesară efectuarea unei diluări a PBMC înainte de numărare. O diluare inițială recomandată este 1:10, însă aceasta variază în funcție de tipul de aparat folosit.

7.4.17.2 Se înregistrează numărul.

- 35 7.4.18 Se ajustează concentrația PBMC la 1.3×10^7 celule/mL conform etapei 7.4.15.2 folosind mediu CM2/IL-2. Se amestecă bine prin agitare ușoară sau prin aspirare ușoară folosind o pipetă serologică.

Organizarea baloanelor de cultură

- 40 7.4.19 Se reintroduc două baloane T25 etichetate în BSC din incubatorul de cultură tisulară.

7.4.20 Se reintroduce fiola de 10µg/ml de anti-CD3/OKT3 în BSC.

7.4.21 Se adaugă 1ml de 1.3×10^7 suspensie celulară PBMC în fiecare balon.

7.4.22 Se adaugă 60µl de 10µg/ml anti-CD3/OKT3 în fiecare balon.

- 45 7.4.23 Se reintroduc baloanele închise în incubatoare de cultură tisulară pentru 14 zile de creștere neperturbată.

7.4.24 Se introduce fiola anti-CD3/OKT3 înapoi în frigider până la utilizare pentru lotul următor.

7.4.25 Se repetă etapele 7.4.9 - 7.4.24 pentru fiecare lot PBMC evaluat.

Ziua 14, măsurarea neopliferării PBMC

- 50 7.4.26 Lucrând cu fiecare lot independent, se reintroduc cu grijă baloanele T25 duplicat în BSC.

7.4.27 Pentru fiecare balon, folosind o pipetă serologică nouă de 10ml, se îndepărtează ~17ml din fiecare balon, se extrage cu grijă mediul rămas pentru a măsura volumul rămas în baloane. Se înregistrează volumul.

7.4.28 Se amestecă proba cu pipeta folosind aceeași pipetă serologică.

7.4.29 Se îndepărtează o probă de 200µl din fiecare balon pentru numărare.

- 55 7.4.30 Se numără celulele folosind un aparat automat.

7.4.31 Se repetă etapele 7.4.26 - 7.4.31 pentru fiecare lot PBMC evaluat.

REZULTATE ȘI CRITERIU DE APROBARE**Rezultate**

10.1.1 S-a preconizat că doza de radiație gamma este suficientă pentru a face celulele feeder incompetente de replicare. S-a preconizat că toate loturile îndeplinesc criteriul de evaluare, demonstrând o reducere a numărului total de celule feeder viabile rămase în ziua 14 a culturii REP comparativ cu ziua 0.

Criteriu de aprobare

10.2.1 S-a îndeplinit următorul criteriu de aprobare pentru fiecare lot de PBMC de la donatori iradiate testate:

10.2.2 "Fără creștere" - înseamnă că numărul total al celulelor viabile în ziua 14 a fost mai mic decât numărul celulelor viabile inițiale cultivate în ziua 0 a REP.

10.2.3 Dacă un lot nu îndeplinește criteriul de mai sus, lotul este retestat conform procedurii de testare secundară indicate în secțiunea 10.4.

10.2.4 În urma retestării unui lot nereușit, lotul feeder MNC care nu a îndeplinit criteriul de aprobare în evaluarea inițială și a doua testare a fost exclus.

Testarea secundară a loturilor PBMC care nu îndeplinesc criteriul de aprobare.

10.4.1 În cazul în care PBMC de la donatori iradiate nu au îndeplinit criteriul de mai sus, se vor efectua următoarele etape de retestare a lotului pentru excluderea erorii experimentale ca o posibilă cauză.

10.3.2 Dacă sunt două sau mai multe fiole de testare satelit rămase din lot, lotul se retestează. Dacă rămâne o singură fiolă de testare satelit sau nici una, lotul nu a trecut de criteriul de aprobare indicat în secțiunea 10.2 de mai sus.

10.4.3 Când este posibil, doi operatori calificați (de preferință inclusiv persoana inițială care a evaluat lotul în cauză) efectuează testarea celor două fiole separate independent. Aceasta este metoda preferată de testare secundară. Pe lângă fiolele separate de PBMC, se pot folosi aceiași reactivi de cei doi operatori.

10.4.3.1. Dacă nu sunt disponibili doi operatori, o persoană testează cele două fiole PBMC pentru lotul nereușit, lucrând cu fiecare fiolă în mod independent.

10.4.4 Se repetă secțiunea 7.4 "Protocol experimental" pentru re-evaluarea lotului în cauză.

10.4.5 Pe lângă lotul în cauză, se testează un lot de control de către fiecare persoană care realizează testarea secundară.

10.4.5.1 Dacă doi operatori efectuează testarea secundară, ambii testează lotul de control independent.

10.4.5.2 Dacă este disponibilă doar o persoană pentru testarea secundară, nu este necesară testarea lotului de control în duplicat.

10.4.5.3 Pentru calificarea unui lot PBMC supus testării secundare, atât lotul de control, cât și reproducerea lotului în cauză trebuie să îndeplinească criteriul de aprobare de la secțiunea 10.2.

10.4.5.4 La îndeplinirea acestui criteriu, lotul este eliberat pentru utilizare CMO conform secțiunii 10.2.

EXEMPLUL 15: APARAT AUTOMAT CELLOMETER IC2 IMAGE CYTOMETER

Acest exemplu descrie procedura de operare a aparatului de numărare automat Cellometer K2 Image Cytometer.

1. Definiții

45	μl	Microlitru
	AOPI	Iodură de propidiu acridină portocalie
	BSC	Cabinet de biosecuritate
	DPBS	Ser fiziologic tamponat cu fosfat Dulbecco
	ml	Mililitru
50	MNC	Celule mononucleare
	NA	Inaplicabil
	PBMC	Celule mononucleare din sângele periferic
	PPE	Echipament personal de protecție
	Pre-REP	Cultură TIL inițială înaintea Protocolului de expansiune rapidă a culturii
55	REP	Protocol de expansiune rapidă
	TIL	Limfocite infiltrante în tumori

7. Procedură

7.1 Preparare suspensie celulară

- 5 7.1.1 Preparare albastru Trypan. Concentrația finală așbastru Trypan a fost 0.1%. producătorul a recomandat o soluție de bază de 0.2%.
- 7.1.1.1 La folosirea albastru Trypan pe Cellometer K2, se diluează soluția (0.4 %) cu PBS la 0.2 %.
- 7.1.1.2 Se filtrează albastru Trypan cu un filtru de 0.2-0.4 microni și se împarte în volume mici în tuburi închise, etichetate.
- 7.1.1.3 Se amestecă suspensia celulară la 1:1 cu 0.2 % albastru Trypan.
- 10 7.1.2 Preparare AOPI
- 7.1.2.1 La folosirea AOPI pe Cellometer K2, se obține soluția AOPI.
- 7.1.2.2 Se colorează proba celulară la 1:1 cu soluție AOPI.
- 15 NOTĂ: La numărarea culturilor în concentrație mare, se diluează probele în mediu de cultură celulară înainte de diluarea 1:1 finală cu albastru Trypan sau AOPI. Se utilizează intervalul de numărare sugerat de producător pentru determinarea celei mai bune diluări de folosit.
- 7.2 Configurare Cellometer K2
- 7.2.1 Se pornește echipamentul Cellometer K2.
- 7.2.2 Se selectează simbolul Cellometer Image Cytometer de pe monitorul computerului asociat.
- 7.2.3 Din ecranul principal software, se selectează unul din testele indicate în căsuța derulantă.
- 20 7.2.3.1 La selectarea testului adecvat, aoar Tipul celular și Mod imagine.
- 7.2.3.2 La secțiunea "Probă", se face click pe ID utilizator/probă pentru deschiderea unui alt ecran de introducere a informațiilor de operator pentru specimen.
- 7.2.3.2.1 Se introduce "ID utilizator", constând din trei inițiale ale utilizatorului.
- 7.2.3.2.2 Se introduce "ID probă", obținut din informațiile de intrare pentru specimen.
- 25 7.2.3.3 Se setează parametrii de diluare.
- 7.2.3.3.1 Dacă nu se efectuează altă diluare pe lângă amestecul 1:1, factorul de diluare a fost 2.
- 7.2.3.3.2 Dacă se efectuează o diluare înainte de amestecul 1:1 final, factorul de diluare a fost de 2 ori diluarea anterioară.
- 7.2.3.3.3 Se actualizează factorul de diluare conform amestecului folosit în secțiunea de diluare a ecranului.
- 30 Se face click pe simbolul creion pentru a apărea ecranul de dialog.
- 7.2.3.3.4 Se verifică dacă secțiune Imagine F1 și Imagine F2 sunt identice.
- 7.2.3.3.5 Se face click pe butonul "Salvează" după încheierea setării.
- 7.3 Se numără celulele
- 35 7.3.1 Se îndepărtează suportul de plastic depe cele două laturi ale unei lame a camerei de numărare Cellometer (SD100) și se așază pe un prosop curat, fără scame.
- 7.3.2 După prepararea suspensiei celulare, se îndepărtează o parte mică de probă și se transferă într-un godeu al unei plăci de cultură celulară cu mai multe godeuri sau tub.
- 7.3.3 dacă se diluează proba, se efectuează diluarea folosind mediul de cultură celulară.
- 40 7.3.4 Se adaugă 20 111 de suspensie celulară într-un godeu al plăcii de cultură celulară cu mai multe godeuri sau tub.
- 7.3.5 Se adaugă 20 111 de 0.2% albastru Trypan sau soluție AOPI în 20111 de suspensie celulară și se amestecă bine proba.
- 7.3.6 Se măsoară 20 IA din soluție 1:1 și se transferă într-o parte a camerei de numărare.
- 45 NOTĂ: a se evita atingerea zonei curate a lamei.
- 7.3.7 Dacă este necesar, se repetă proba pe cealaltă parte a lamei.
- 7.3.8. Se introduce în cameră în fanta de pe fața Cellometer.
- 7.3.8 Pentru numărarea celulelor AOPI, se face click pe "Previzualizare F1" pe ecranul principal pentru a previzualiza imaginea fluorescentă verde (celulă vie). Pentru numărarea albastru Trypan, se face click pe "Previzualizare câmp luminos".
- 50 7.3.9 Folosind roțița de focalizare, se aduce imaginea la focalizare optimă. Celulele au centru luminos și o margine bine definită.
- 7.3.10 Se face click pe "Numărare" pentru a începe procesul de numărare.
- 7.3.11 Rezultatele se afișează într-o căsuță de numărare care apare pe ecranul computerului, indicând rezultatele procesului de numărare.

EXEMPLUL 16: PREPARAREA SOLUȚIEI DE BAZĂ IL-2 (CELLGENIX)

Acest exemplu descrie procesul de dizolvare a unei interleukine-2 umane recombinante purificate, liofilizate, în probe adecvate pentru utilizare în alte protocoale de cultură tisulară, inclusiv toate cele descrise în prezenta cerere și în exemple, inclusiv care care utilizează rhIL-2.

3. Definiții/abrevieri

- 5 μL: microlitru
 BSC: Cabinet de biosecuritate
 BSL2: Nivel de biosecuritate 2
 D-PBS: Ser fiziologic tamponat cu fosfat Dulbecco
 G: Calibru
 GMP: Bună practică de producție
 10 HAc: Acid acetic
 HSA: Albumină serică umană
 mL: Mililitru
 NA: Inaplicabil
 PPE: Echipament personal de protecție
 rhIL-2; IL-2: interleukina-2 umană recombinantă
 15 COA: Certificat de analiză

6. Procedură

- 20 6.1 Se prepară 0.2% soluție de acid acetic (HAc).
 20 6.1.1 Se transferă 29mL apă sterilă într-un tub conic de 50ml.
 6.1.2 Se adaugă 1mL 1N acid acetic în tubul conic de 50ml.
 6.1.3 Se amestecă bine prin întoarcerea tubului de 2-3 ori.
 6.1.4 Se sterilizează soluția HAc prin filtrare folosind un filtru Steriflip.
 6.1.5 Se închide, se datează și se etichetează soluția "soluție sterilă de acid acetic 0.2%".
 25 6.1.6 Soluția expiră după 2 luni. Se depozitează la temperatura camerei.
 6.2 Se prepară 1% HSA în PBS.
 6.2.1 Se adaugă 4mL de 25% soluție HSA în 96mL PBS într-o unitate de filtrare sterilă 150mL.
 6.2.2 Se filtrează soluția.
 6.2.3 Se închide, se datează și se etichetează soluția "1% HSA în PBS."
 30 6.2.4 Soluția expiră după 2 luni. Se depozitează la 4°C.
 6.3 Pentru fiecare fiolă de rhIL-2 preparată, se completează formulare.
 6.4 Se prepară o soluție de bază de rhIL-2 (6×10^6 IU/mL concentrație finală)
 6.4.1 Fiecare lot de rhIL-2 a fost diferit și a necesitat informații din Certificatul de analiză (COA) al
 producătorului, cum ar fi:
 35 6.4.1.1 Masa rhIL-2 per fiolă (mg)
 6.4.1.2 Activitatea specifică a rhIL-2 (IU/mg)
 6.4.1.3 Volum de reconstituire 0.2% HAc recomandat (mL)
 6.4.2 Se calculează volumul 1% HSA necesar pentru lotul rhIL-2 folosind ecuația de mai jos:
 Masă fiolă (mg) x Activitate specifică

40

$$\left(\frac{\text{Vial Mass (mg)} \times \text{Biological Activity} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - \text{HAc vol (mL)} = 1\% \text{ HSA vol (mL)}$$

45

- 6.4.2.1 De exemplu, conform COA CellGenix lot rhIL-2 10200121, activitatea specifică pentru fiola de
 lmg este 25×10^6 IU/mg. Recomandă reconstituirea rhIL-2 în 2mL 0.2% HAc.

$$\left(\frac{1 \text{mg} \times 25 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mg}}}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - 2 \text{mL} = 2.167 \text{mL HSA}$$

50

- 6.4.3 Se șterge dopul de cauciuc al fiolei IL-2 cu alcool.
 6.4.4 Folosind un ac 16G atașat la o seringă de 3mL, se injectează volumul recomandat de 0.2% HAc în
 fiolă, cu atenție să se nu se deplaseze dopul la extragerea acului.
 6.4.5 Se întoarce fiola de 3 ori și se agită până când se dizolvă toată pulberea.
 6.4.6 Se îndepărtează cu grijă dopul și se lasă de-o parte pe un tampon cu alcool.

6.4.7 Se adaugă volumul calculat de 1% HSA în fiolă.

6.4.8 Se închide fiola dopul de cauciuc.

6.5 Se depozitează soluția rhIL-2

6.5.1 Pentru depozitare pe termen scurt (<72h), se depozitează fiola la 4°C.

5 6.5.2 Pentru depozitare pe termen lung (>72h), se împarte fiola în volume mai mici și se depozitează în criofiole la -20°C până când este gata de utilizare. Se evită ciclurile îngheț/dezghet. Expiră la 6 luni de la data preparării.

6.5.3 Etichetele Rh-IL-2 au inclus vânzătorul și numărul de catalog, numărul de lot, data de expirare, inițialele operatorului, concentrația și volumul părții alicote.

10

EXEMPLUL 17: PREPARAREA MEDIULUI PENTRU PROCESE PRE-REP ȘI REP

Acest exemplu descrie procedura de preparare a mediului de cultură tisulară pentru utilizare în protocoale cuprinzând cultură de limfocite infiltrante în tumori (TIL) derivate din diferite tipuri tumorale inclusiv, dar nelimitativ, melanom metastatic, carcinom cu celule scuamoase la cap și gât (HNSCC), carcinom ovarian, carcinom mamar triplu negativ și adenocarcinom pulmonar. Acest mediu poate fi folosit pentru prepararea oricăror TIL descrise în prezenta cerere și în exemple.

15

3. Definiții

20

μg	microgram
μm	micrometru
μM	micromolar
AIM-V®	mediu de cultură tisulară fără ser (Thermo Fisher Scientific)
BSC	Cabinet de biosecuritate

25

CM1	Mediu complet #1
CM2	Mediu complet #2
CM3	Mediu complet #3
CM4	Mediu complet #4

30

IU sau U	Unități internaționale
ml	mililitru
mM	milimolar
NA	inaplicabil

35

PPE	echipament personal de protecție
Pre-REP	pre-proces de expansiune rapidă
REP	proces de expansiune rapidă
rhIL-2, IL-2	Interleukina-2 umană recombinantă
RPMI1640	mediu Roswell Park Memorial Institute, compoziție 1640
SOP	Procedură operațională standard
TIL	limfocite infiltrante în tumori

40

7. Procedură

7.1 Toate procedurile se efectuează folosind tehnica sterilă în BSC (clasa II, tip A2).

7.1.1 Se pulverizează suprafața capacului cu 70% etanol înainte de utilizare.

45

7.1.2 Se pulverizează toate obiectele și reactivii cu 70% etanol înainte de amplasare în capacul de cultură tisulară.

7.2 Se împart 200mM L-glutamină

7.2.1 L-glutamina este furnizată în volume mai mari decât sunt necesare pentru prepararea serului (de ex., volume de 100ml sau 500ml).

7.2.2 Se decongelează flaconul de L-glutamină în baie de apă 37°C.

50

7.2.3 Se amestecă L-glutamina bine după decongelare, fiindcă se precipită după decongelare. Se asigură că toate precipitatele au revenit în soluție înainte de împărțire.

7.2.4 Se introduc părți alicote de 5-10ml L-glutamină în tuburi conice de 15ml sterile.

7.2.5 Se etichetează tuburile cu concentrație, vânzător, număr lot, data adăugării și data de expirare.

7.2.6 Tuburile se depozitează la -20°C și se extrag după necesitate pentru prepararea mediului.

55

7.3 Prepararea CMI

7.3.1 Se îndepărtează următorii reactivi din depozitarea la rece și se încălzesc într-o baie de apă 37°C:

7.3.1.1 RPMI1640

7.3.1.2 Ser AB uman

7.3.1.3 200mM L-glutamină

7.3.2 Se îndepărtează BME din depozitarea la 4°C și se așază în capacul de cultură tisulară.

7.3.3 Se introduce soluția de gentamicină din depozitare la temperatura camerei în capacul de cultură tisulară.

- 5 7.3.4 Se prepară mediul CM1 conform tabelului 23 de mai jos adăugând fiecare ingredient în secțiunea superioară a unei unități de filtrare de 0.2um conform volumului de filtrat.

TABEL 23. Prepararea CM1

Ingredient	Concentrație finală	Volum final 500 ml	Volum final II
RPMI1640	NA	450 ml	900 ml
Ser AB uman, inactivat termic 10%	50 ml	100 ml	
200mM L-glutamină	2 mM	5 ml	10 ml
55mM BME	55 μM	0.5 ml	1 ml
50mg/ml gentamicină sulfat	50 μg/ml	0.5 ml	1 ml

- 10 7.3.5 Se etichetează flaconul de mediu CM1 cu denumirea sa, inițialele preparatorului, data filtrării/preparării, data de expirare de două săptămâni și se depozitează la 4°C până la utilizare pentru cultura tisulară. Mediul poate fi împărțit în flacoane cu volume mai mici, după caz.

7.3.6 RPMI1640, serul AB uman sau L-glutamina rămase se depozitează la 4°C până la următoarea preparare de mediu.

7.3.7 Flaconul de BME se reintroduce la depozitare 4°C.

- 15 7.3.8 Flaconul de gentamicină se întoarce la locul de depozitare TC corespunzător.

7.3.9 Dată fiind capacitatea de tamponare limitată a mediului, CM1 a fost aruncat la nu mai mult de două săptămâni după preparare sau când indicatorul pH fenol roșu a indicat deplasare externă de pH (colorare din roșu deschis în roz).

- 20 7.3.10 În ziua utilizării, se preîncălzește cantitatea necesară de CM1 în baie de apă 37°C și se adaugă 6000 IU/ml IL-2.

7.3.11 Suplimentare adițională - după necesitate

7.3.11.1 CM1 suplimentat cu GlutaMAX®

- 25 7.3.11.1.1 CM1 se poate prepara cu 2mM GlutaMAX™ în loc de 2mM glutamină (concentrație finală, vezi tabelul 2.) În acest caz, se etichetează flaconul cu mediu ca în etapa 7.3.5 de mai sus, adăugând "2mM GlutaMAX" pentru a preveni confuzia cu compoziția standard de CM1.

7.3.11.2 CM1 suplimentat cu extra antibiotic/antimicotic

7.3.11.2.1 Unele compoziții CM1 au necesitat antibiotic sau antimicotic suplimentar pentru a preveni contaminarea TIL pre-REP crescute din anumite tipuri de tumori.

7.3.11.2.2 Se adaugă antibiotic/antimicotic la concentrațiile finale indicate în Tabelul 24 de mai jos.

- 30 7.3.11.2.3 În acest caz, se etichetează flaconul cu mediu ca în etapa 7.3.1 de mai sus, adăugând denumirea antibioticului/antimicoticului suplimentar pentru a preveni confuzia cu compoziția standard de CM1.

TABEL 24. Suplimentare adițională a CM1, după necesitate.

Supliment	Concentrație	Diluare	Concentrație finală
GlutaMAX™	200mM	1:100	2mM
Penicilină/streptomicină	10.000 U/ml penicilină	1:100	100 U/ml penicilină
	10.000μg/ml streptomicină		100 μg/ml streptomicină
Amfotericina B	250μg/ml	1:100	2.5μg/ml

- 35 7.4 Preparare CM2

7.4.1 Se îndepărtează CM1 preparat din frigider sau se prepară CM1 proaspăt conform secțiunii 7.3 de mai sus.

7.4.2 Se îndepărtează AIM-V® din frigider.

- 40 7.4.3 Se prepară cantitatea de CM2 necesară, amestecând CM1 preparat cu un volum egal de AIM-V® într-un flacon de mediu steril.

7.4.4 Se adaugă 3000 IU/ml IL-2 în mediul CM2 în ziua utilizării.

7.4.5 Se prepară suficientă cantitate de CM2 cu 3000 IU/ml IL-2 în ziua utilizării.

7.4.6 Se etichetează flaconul de mediu CM2 media cu denumirea, inițialele preparatorului, data filtrării/preparării, data de expirare de două săptămâni și se depozitează la 4°C până la utilizare pentru cultura tisulară. Mediul este împărțit în flacoane cu volume mai mici, după caz.

7.4.7 Se reintroduce CM2 fără IL-2 în frigider, unde poate fi depozitat până la două săptămâni sau până când indicatorul pH fenol roșu indică deplasare externă de pH (colorare din roșu deschis în roz).

7.5 Preparare CM3

7.5.1 Se prepară CM3 în ziua utilizării.

7.5.2 CM3 a fost identic cu mediul AIM-V®, suplimentat cu 3000 IU/ml IL-2 în ziua utilizării.

7.5.3 Se prepară o cantitate de CM3 suficientă pentru necesitățile experimentale adăugând soluție de bază IL-2 direct în flaconul sau punga de AIM-V. Se amestecă bine prin agitare ușoară. Se etichetează flaconul cu "3000 IU/ml IL-2" imediat după adăugare în AIM-V. Dacă a existat surplus de CM3, se depozitează în flacoane la 4°C etichetate cu denumirea mediului, inițialele preparatorului, data preparării mediului și data de expirare (7 zile după preparare).

7.5.4 Se elimină mediul suplimentat cu IL-2 după 7 zile depozitare la 4°C.

7.6 Preparare CM4

7.6.1 CM4 a fost identic cu CM3, cu supliment adițional 2mM GlutaMAX™ (concentrație finală).

7.6.1.1 Pentru fiecare 1L de CM3, se adaugă 10ml de 200mM GlutaMAX™.

7.6.2 Se prepară o cantitate de CM4 suficientă pentru necesitățile experimentale adăugând soluție de bază IL-2 și soluție GlutaMAX™ direct în flaconul sau punga de AIM-V. Se amestecă bine prin agitare ușoară.

7.6.3 Se etichetează flaconul cu "3000 IU/ml IL-2 și GlutaMAX™" imediat după adăugare în AIM-V.

7.6.4 Dacă a existat surplus de CM4, se depozitează în flacoane la 4°C etichetate cu denumirea mediului, "GlutaMAX™", inițialele preparatorului, data preparării mediului și data de expirare (7 zile după preparare).

7.6.5 Se elimină mediul suplimentat cu IL-2 după 7 zile depozitare la 4°C.

EXEMPLUL 18: COLORAREA CU ANTIGEN DE SUPRAFAȚĂ A TIL POST REP

1. OBIECTIV

Exemplul descrie procedura de colorare de suprafață a TIL post-REP prin citometrie în flux. Această procedură se poate aplica oricăror TIL descrise în cerere și în exemple.

TERMENI PRINCIPALI ȘI DEFINIȚII

α :	Alpha
β :	Beta
μ l:	Microlitru
APC:	Aloficocianina
Ax647:	Alex Fluor 647
BD:	Becton Dickinson Company
BSA:	Albumină serică bovină
BSC:	Cabinet de biosecuritate
BV421:	Brilliant Violet 421
CD:	Grup de diferențiere
CST:	Configurare și urmărire citometru
Cy:	Cianină
DPBS:	Ser fiziologic tamponat cu fosfat Dulbecco
FACS:	Sortare celulară activată fluorescent
FBS:	Ser bovin fetal
FITC:	Izotiocianat de fluoresceină
FMO:	Fluorescence Minus One
G:	Gram
H7:	Analog Cy7
ml:	Mililitru
PE:	Ficoeritrina
PerCP-Cy5.5:	Proteine peridinin-clorofila
PPE:	Echipament personal de protecție
REP:	Protocol de expansiune rapidă
SIT:	Tub injecție probe
TCR:	Receptor T celular
g/v:	Greutate la volum

Anticorpi și coloranți pentru citometrie în flux

TABEL 25: Colorant Aqua ThermoFisher Catalog # L34966.

Țintă	Format	Clonă	Furnizor	Număr catalog
TCRab (<i>i.e.</i> , 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

5

7. PROCEDURĂ

7.1 Preparare reactiv

7.1.1 Tampon spălare FACS

7.1.1.1 Se adaugă 2% (g/v) FBS inactivat termic în DPBS (se adaugă 10ml FBS în 490ml IX dPBS).

10 7.1.1.2 Se adaugă 0.1% (g/v) NaN₃ (76.9ul în flacon de 500mL.)

7.1.1.3 Soluția se depozitează la 40°C. Se aruncă după 30 zile.

7.1.2 Colorant Aqua

7.1.2.1 Se adaugă 50μl DMSO în fiola de colorant reactiv.

7.1.2.2 Se amestecă bine și se confirmă vizual dizolvarea întregului colorant.

15 7.1.2.3 Colorantul neutilizat în procedură a fost împărțit în părți alicote și congelat la 20°C până la utilizarea următoare. Nu se congelează/decongelează o a doua oară.

7.1.3 Preparare amestec anticorpi.

7.1.3.1 Amestecurile se prepară în tuburi de polipropilenă cum ar fi un tub Eppendorf

7.1.3.2 Amestecurile se depozitează până la 6 luni.

20

Tabel 26: Grup de diferențiere 1 (DF1):

Țintă	Format	Clonă	Furnizor	Nr. catalog	Titru
TCRab (<i>i.e.</i> , TCR α/β)	PE/Cy7	IP26	BioLegend	306720	3
CD57*	PerCP-Cy5.5	HNK-1	BioLegend	359622	2

MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

117

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
soluție tampon FACS					33

Tabel 27: Grup de diferențiere 2 (DF2):

Țintă	Format	Clonă	Furnizor	Nr. catalog	Titru
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
CCD4	APC/Cy7	OKT4	BioLegend	317418	2
CCD38*	APC	HB-7	BioLegend	356606	1
HHLA-DR	PB	L243	BioLegend	307633	2
soluție tampon FACS					35

Tabel 28: Grup de activare celule T 1 (Tact 1):

Țintă	Format	Clonă	Furnizor	Nr. catalog	Titru
CD137*	PE/Cy7	4B4-1	BioLegend	309818	2
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	BD Biosciences	552852	2
Lag3*	PE	3DS223H	eBioscience	12-2239-42	5
CD8	FITC	HIT8	BioLegend	300906	2
CD4	APCCy7	OKT4	BioLegend	317418	2
PD1*	APC	EH12.2H7	BioLegend	329908	2
Tim-3*	BV421	F38-2E2	BioLegend	345008	2
soluție tampon FACS					33

5

Tabel 29: Grup de activare celule T 2 (Tact 2):

Țintă	Format	Clonă	Furnizor	Nr. catalog	Titru
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*	Ax647	SA231A2	BioLegend	367704	1
CD154*	BV421	TRAP1	BD Biosciences	563886	3
soluție tampon FACS					34

7.2 Cerințe test citometrie în flux

7.2.1 Calibrare citometru

10 7.2.1.1 Citometrul în flux a fost calibrat în ziua testului folosind sfere CST urmând instrucțiunile producătorului.

7.2.1.2 Operatorul se asigură că citometrul în flux trece calibrarea, verificările de performanță și referință fiind valide.

7.2.2 Compensare/Control FMO

15 7.2.2.1 S-au preparat probe de compensare monocrome folosind sfere de compensare BD și kitul ArCTM Amine Reactive Compensation Bead.

7.2.2.2 Control FMO, probele conținând celule au fost colorate cu un amestec de anticorpi minus următorul conjugat anticorp individual, CD27, CD28 și CD57.

7.2.3 Standardizare MFI

20 7.2.3.1 Tensiunile citometrului s-au determinat zilnic cu un control și valori de tensiune țintă.

7.3 Colorare probe

7.3.1 Se etichetează tubul FACS cu proba ID-DF1, proba ID-DF2, proba ID-T1, proba ID-T2.

7.3.2 Se etichetează un set de control FMO cu 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 și CD154-BV421.

7.3.3 Se adaugă 0.5 - 2 milioane celule în fiecare tub.

7.3.4 QS până la 3mL 1xPBS în fiecare tub.

7.3.5 Se centrifughează tuburile la 400 x g, accelerație mare și frână, 5 minute.

7.3.6 În timp ce tuburile sunt centrifugate, se prepară colorantul Aqua de marcarea a celulelor moarte.

10 7.3.7 Se îndepărtează o parte alicotă de Aqua din congelator și se diluează 1/200 în PBS. Se păstrează la întuneric. Se adaugă 2uL colorant în 198uL DPBS.

7.3.8 Se decantează sau se aspiră supernatantul de la etapa 7.3.5.

7.3.9 Se adaugă 25uL soluție Aqua de mai sus în probe și control FMO.

7.3.10 Se incubează 15 minute la temperatura camerei (TC) în întuneric.

15 7.3.11 Notă: dacă celulele s-au depozitat inițial într-un mediu fără proteină, trebuie adăugată o etapă de blocare, cum ar fi 5uL TruStain 10 minute la temperatura camerei.

7.3.12 Se adaugă 50uL de amestecuri de anticorpi în tuburi corespunzătoare.

7.3.13 Se agită suportul de tub pentru a se amesteca.

7.3.14 Se incubează 15 minute la RT în întuneric.

20 7.3.15 Se înregistrează ora de începere și de încheiere. Se adaugă 3mL tampon spălare FACS.

7.3.16 Se centrifughează tuburile la 400 x g, accelerație mare și frână, 5 minute.

7.3.17 La încheierea centrifugării, se decantează sau se aspiră supernatantul.

7.3.18 Se resuspendă celulele prin alunecarea tuburilor de-a lungul unui suport gol.

7.3.19 Se adaugă 100uL de 1% paraformaldehidă în fiecare tub.

25 7.3.20 Se depozitează la 40C în întuneric până la colectare în citometrul în flux. Notă: probele pot fi depozitate până la 72 ore.

7.4 Control compensare L/D Aqua.

7.4.1 Se etichetează tuburile FACS cu control compensare L/D Aqua.

7.4.2 Se adaugă o picătură de sfere Arc în tub.

30 7.4.3 Se adaugă 3μl L/D Aqua direct în sfere.

7.4.4 Se incubează tuburile la temperatura camerei în întuneric 10 - 30min.

7.4.5 Se înregistrează timpul de începe și încheiere a incubării pe fișa de lucru

7.4.6 După incubare, se adaugă 3ml tampon spălare FACS în fiecare tub.

7.4.7 Se centrifughează tuburile la 400 x g, accelerație mare și frână, 5 minute.

35 7.4.8 Se decantează sau se aspiră supernatantul.

7.4.9 Se resuspendă tuburile cu 500μl 1% soluție PFA. Se adaugă 1 picătură de sfere negative. Se introduce la 40°C în întuneric până la colectare.

7.5 Colorare control de compensare.

7.5.1 Se etichetează tuburile FACS așa cum se indică în fișa de lucru Fenotip TIL Post-REP.

40 7.5.2 Se adaugă anticorpii așa cum se indică în fișa de lucru Fenotip TIL Post-REP.

7.5.3 După incubare, se adaugă 3mL tampon FACS în fiecare tub.

7.5.4 Se centrifughează tuburile la 500g, accelerație mare și frână, 2 minute.

7.5.5 Se decantează sau se aspiră supernatantul.

7.5.6 Se resuspendă tuburile cu 500μl 1% PFA în PBS și se depozitează la 2-80°C în întuneric.

45 7.6 Achiziție date

7.6.1 Deschidere software FACSDiva și autentificare.

7.6.2 În dialogul citometrului, se face click pe "Utilizare setări CST".

7.6.3 Se creează un experiment nou apăsând pe fila "Experiment" și selectând șablonul "Fenotip extins".

50 7.6.4 Se face dublu click pe Valori țintă experiment și se ajustează tensiunile pentru a atinge valorile țintă determinată de operator.

7.6.5 Se copiază setările instrumentului în experimentul nou.

7.6.6 Se creează un Specimen pentru fiecare probă individuală și se numește corespunzător.

7.6.7 Se creează nume pentru probe conform etichetelor de pe tuburi.

7.6.8 Se agită ușor sau se lovește cu degetul înaintea așezării tubului în SIT.

55 7.6.9 Se obțin datele la ÎNREGISTRARE în panoul Achiziție.

7.6.10 Probele sunt desfășurate la o viteză mai mică de 7.500 evenimente pe secundă.

7.6.11 Se colectează între 50.000 și 100.000 evenimente vii excluzând reziduurile.

EXEMPLUL 19: DEZVOLTAREA PROCESULUI DE VERIFICARE A PROCESULUI**2A**

Experimentele din acest exemplu s-au efectuat pentru a analiza Procesul 2A de preparare TIL din tumori obținute de la pacienți de melanom și un singur cancer mamar, inclusiv creșterea TIL din tumori într-o procedură pre-REP, urmată de REP modificat. S-a acordat atenție specială formării unui produs TIL congelat și comparării performanței produsul TIL congelat față de procesul actual pentru TIL proaspete (Procesul 1C). Acest raport va demonstra că se observă profiluri similare în evaluarea atributelor de calitate critice pentru produse proaspete și decongelate (număr celule, % viabilitate, % celule T CD3+ și producție gamma interferon (IFN- γ) stimulată cu sfere), precum și o procedură a fenotipului extins de restimulare (reREP) cu produs TIL proaspăt sau congelat. Datele prezentate pentru a susține această concluzie includ proliferare, viabilitate, fenotip, eliberare IFN- γ , potențial, lungimea telomerilor și activitate metabolică. Rezultatele caracterizează Procesul 2A, un proces pre-REP/REP scurtat, urmat de crioconservarea TIL, precum și compararea procesului 2A cu procesul 1C mai lung, descris în prezenta.

Descrierile donatorilor de tumori, datele și locurile de procesare sunt indicate în Tabelul 1 de mai jos (*indică faptul că REP a început folosind o linie TIL pre-REP congelată):

Tabel 30: Descrierea donatorilor de tumori, datele și locurile de procesare.

ID tumoare	Tip țesut	Sursă	Țesut
M1061	Melanom	MT group	Primar - picior stânga lateral
M1062	Melanom	Moffitt	N/A
M1063	Melanom	MT group	Metastatic C - zona inghinală dreapta
M1064	Melanom	MT group	Metastatic C - gleznă stânga
M1065	Melanom	Bio Options	Metastatic - ganglion limfatic axilar
EP11001	ER+PR+	MT group	Primar - carcinom ductal invaziv mamar stânga
M1056*	Melanom	Moffitt	N/A
M1058*	Melanom	MT group	Metastatic - scalp dreapta stadiu IIB
M1023*	Melanom	Atlantic Health	Primar - axila dreaptă

3. INFORMAȚII DE BAZĂ

3.1 LN-144 este un produs imunoterapeutic pentru tratarea pacienților cu melanom metastatic. Produsul a fost alcătuit din limfocite T infiltrante în tumori (TIL) autologe obținute de la un pacient individual în urma rezecției chirurgicale a unei tumore și amplificate ex vivo prin cultura celulară a fragmentelor tumorale (pre-REP), urmată de expansiunea rapidă a TIL în prezența IL-2 în doză mare, anti-CD3 și APC co-stimulatoare. În urma condiționării cu limfodepleție non-mieloablativă, pacientul a primit o singură perfuzie de TIL proprii și perfuzii intravenoase ulterioare de aldesleukină (IL-2) din 8 în 8 ore pentru un maxim de 6 doze. Studiile care implică metode alternative de expansiune TIL în condiția moleculelor de tipar molecular asociat cu deteriorare (DAMP) în micromediul tumoral (TNE) au demonstrat de asemenea expansiune eficientă a celulelor T utile pentru terapie (Donia 2014; Sommerville, 2012).

Procesul 1C folosit pentru producerea comercială a TIL presupune un program care poate dura -45-55 zile pentru a produce un produs TIL perfuzabil furnizat unui pacient cu imunodepleție în 24 de ore.

Imunodepleția pacientului trebuie planificată exact cu recoltarea produsului TIL. Întârzierile de recoltare sau furnizare a produsului proaspăt pot afecta negativ un pacient cu imunodepleție care așteaptă perfuzia.

Procesul 2A a îmbunătățit Procesul 1C prin scăderea timpului de producție și a materialelor, datorită scurtării procedurilor pre-REP și REP. În plus, Procesul 2A a crescut flexibilitatea timpului de transport al produsului. Diferențele între Procesul 1C și Procesul 2A în pre-REP, REP și recoltarea procesului (vezi tabelul 2) includ:

3.1.1 Baloane mai mari cu capacitate mărită pentru fragmente tumorale folosite în procedura pre-REP.

3.1.2 Etape care utilizează sistem închis sau sunt adaptabile la un sistem închis.

3.1.3 Număr scăzut de zile în procedurile pre-REP și REP.

3.1.4 O metodă directă REP, eliminând necesitatea fenotipării populațiilor pre-REP înainte de selectarea populațiilor specifice de TIL pre-REP pentru a continua cu REP.

3.1.5 O co-cultură cu un număr predeterminat de APC PBMC alogenice iradiate împreună cu anti-CD3

(clona OKT3) calculat pentru expansiune suficientă a TIL.

3.1.6 Un sistem de spălare celulară automat pentru recoltare.

3.1.7 O compoziție finală pe bază de CS10 conservată criogenic înainte de transport.

5 Tabel 31: Impactul procesului 2A asupra procesului 1C.

Etapă proces	Proces 1C	Proces 2A	Impact
ETAPA A: Obținerea probei tumorale de la pacient	<ul style="list-style-type: none"> După intervenția chirurgicală, pot fi congelate după recoltare și înainte de Etapa B. 	<ul style="list-style-type: none"> După intervenția chirurgicală, pot fi congelate după recoltare și înainte de Etapa B. 	<ul style="list-style-type: none"> Identic.
ETAPA B: Prima expansiune	<ul style="list-style-type: none"> Fragmentare fizică 	<ul style="list-style-type: none"> Fragmentare fizică 	<ul style="list-style-type: none"> Fragmente tumorale mărite per balon
	<ul style="list-style-type: none"> 4 fragmente per 10 baloane G-REX -10 	<ul style="list-style-type: none"> 40 fragmente per 1 balon G-REX -100M 	<ul style="list-style-type: none"> Timp de cultură scurtat
	<ul style="list-style-type: none"> durată 11-21 zile 	<ul style="list-style-type: none"> durată 11 zile (interval 3 zile până la 14 zile) 	<ul style="list-style-type: none"> Număr redus de etape
	<ul style="list-style-type: none"> mediul de creștere cuprinde IL-2 	<ul style="list-style-type: none"> mediul de creștere cuprinde IL-2 	<ul style="list-style-type: none"> Adaptare la sistem închis
ETAPA C: Tranziția de la prima expansiune la a doua expansiune	<ul style="list-style-type: none"> TIL din Etapa B sunt congelate până la fenotipare pentru selecție, apoi se decongelează pentru a continua la etapa D (~ziua 30) 	<ul style="list-style-type: none"> TIL din Etapa B trec direct la etapa D în ziua 11 a Etapei B 	<ul style="list-style-type: none"> Proces pre-REP-REP scurtat
	<ul style="list-style-type: none"> Etapa D necesită $>40 \times 10^6$ TIL 	<ul style="list-style-type: none"> Etapa D necesită $25-200 \times 10^6$ TIL 	<ul style="list-style-type: none"> Număr redus de etape
	<ul style="list-style-type: none"> 6 baloane G-REX -100M în ziua 0 a Etapei D 	<ul style="list-style-type: none"> 1 balon G-REX -500M în ziua 11 a Etapei B 	<ul style="list-style-type: none"> Selecție de fenotipare eliminată Adaptare la sistem închis
			<ul style="list-style-type: none"> Număr redus de etape Durată REP mai scurtă
ETAPA D: A doua expansiune	<ul style="list-style-type: none"> 5×10^6 TIL și 5×10^8 celule feeder de prezentare a antigenului per balon în ziua 0 a Etapei D 	<ul style="list-style-type: none"> $25-200 \times 10^6$ TIL și 5×10^9 celule feeder de prezentare a antigenului în ziua 11 a Etapei B 	<ul style="list-style-type: none"> Transfer TIL în sistem închis între baloane
	<ul style="list-style-type: none"> Împărțire în ≤ 6 baloane G-REX - 500M în ziua 16 	<ul style="list-style-type: none"> Împărțire în ≤ 6 baloane G-REX - 500M în ziua 16 	<ul style="list-style-type: none"> Schimb de mediu în sistem închis
	<ul style="list-style-type: none"> Împărțire în 18-36 baloane în ziua 7 a Etapei D 	<ul style="list-style-type: none"> durată 11 zile pentru Etapa D 	
	<ul style="list-style-type: none"> durată 14 zile pentru Etapa D Mediul de creștere cuprinde IL-2, OKT-3 și 	<ul style="list-style-type: none"> Mediul de creștere cuprinde IL-2, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului 	

Etapă proces	Proces 1C	Proces 2A	Impact
	celule de prezentare a antigenului		
ETAPA E: Recoltare TIL	<ul style="list-style-type: none"> TIL recoltate prin centrifugare 	<ul style="list-style-type: none"> TIL recoltate prin sistem de spălare celulară automat LOVO 	<ul style="list-style-type: none"> Număr redus de etape Spălare celulară automată Sistem închis Pierdere redusă de produs în timpul spălării
ETAPA F: Compoziție finală/transfer punga de perfuzie Timp total estimat	<ul style="list-style-type: none"> Produs proaspăt în Hypothermosol 	<ul style="list-style-type: none"> Produs crioconservat în PlasmaLyte-A + 1% HSA și CS10 depozitat în LN2 	<ul style="list-style-type: none"> Flexibilitate de transport Programare flexibilă pacient
	<ul style="list-style-type: none"> O singură pungă de perfuzie 	<ul style="list-style-type: none"> Multiple părți alicote 	<ul style="list-style-type: none"> Testare mai rapidă
	<ul style="list-style-type: none"> Stabilitate limitată în timpul transportului 	<ul style="list-style-type: none"> Stabilitate mai îndelungată la transport 	
	<ul style="list-style-type: none"> 43-55 zile de la etapa A până la Etapa E 	<ul style="list-style-type: none"> 22 zile de la etapa A la Etapa E 	<ul style="list-style-type: none"> Întoarcere mai rapidă la pacient Tranzit redus în camera cu atmosferă controlată

4. ABREVIERI

5	μg	microgram
	μl	microlitru
	μm	micrometru
	APC	Celule de prezentare a antigenului
	CD	Grup de diferențiere
	CM	Memorie centrală
10	CM1, CM2,	Mediu de cultură 1, 2
	CO2	Dioxid de carbon
	CS10	Mediu de crioconservare CryoStor® CS10 (BioLife Solutions)
	Ct	Ciclu prag PCR
	DAMPs	Molecule de tipar molecular asociat cu deteriorare
15	dCt	Diferență între valoarea Ct de referință și valoarea Ct testată
	ddCt	Diferență între dCt și 10ng valoare Ct standard
	ECAR	Rată de acidificare extracelulară (măsurare glicoliză)
	EM	Memorie efctoare
	ER+/PR+	Receptor estrogen+/Receptor progesteron +
20	GMP	Bune practici de producție
	HBSS	Soluție salină echilibrată Hanks
	HAS	Albumină serică umană
	IFN-γ	Interferon gamma
	IL	Interleukina
25	IU	Unități internaționale
	LN2	Azot lichid

	MI	mililitru
	Mm	milimetru
	ND	nedeterminat
	Ng	Nanogram
5	°C	grade Celsius
	OCR	Rată consum oxigen (măsurare fosforilare oxidativă)
	OKT3	Denumirea clonei anticorpului monoclonal anti-CD3
	PBMC	Celule mononucleare din sângele periferic
	PD	Dezvoltarea procesului
10	REP	Protocol de expansiune rapidă
	Rh	Uman recombinant
	SOP	Procedură operațională standard
	T/S	Raport număr copii repetiție telomerică la număr copii genice individuale
	TIL	Limfocit infiltrant tumoral
15	VDJ	Segmente variabile, diversitate și juxtapuse ale receptorului T celular
	V α , V β	Segmentele regiunii variabile ale receptorilor T celulari maturi în limfocitul infiltrant tumoral predominant
	μ g	microgram
	μ l	microlitru
20	μ m	micrometru
	APC	Celule de prezentare a antigenului
	CD	Grup de diferențiere
	CM	Memorie centrală
	CM1, CM2,	Mediu de cultură 1, 2
25	CO ₂	Dioxid de carbon
	CS10	Mediu de crioconservare CryoStor® CS10 (BioLife Solutions)
	Ct	Ciclu prag PCR
	DAMPs	Molecule de tipar molecular asociat cu deteriorare
	dCt	Diferență între valoarea Ct de referință și valoarea Ct testată
30	ddCt	Diferență între dCt și 10ng valoarea Ct standard
	ECAR	Rată de acidificare extracelulară (măsurare glicoliză)
	EM	Memorie efectorie
	ER+/PR+	Receptor estrogen+/Receptor progesteron +
	GMP	Bune practici de producție
35	HBSS	Soluție salină echilibrată Hanks
	HAS	Albumină serică umană
	IFN- γ	Interferon gamma
	IL	Interleukina
	IU	Unități internaționale
40	LN2	Azot lichid
	MI	mililitru
	Mm	milimetru
	ND	nedeterminat
	Ng	Nanogram
45	°C	grade Celsius
	OCR	Rată consum oxigen (măsurare fosforilare oxidativă)
	OKT3	Denumirea clonei anticorpului monoclonal anti-CD3
	PBMC	Celule mononucleare din sângele periferic
	PD	Dezvoltarea procesului
50	REP	Protocol de expansiune rapidă
	Rh	Uman recombinant
	SOP	Procedură operațională standard
	T/S	Raport număr copii repetiție telomerică la număr copii genice individuale
	TIL	Limfocit infiltrant tumoral
55	VDJ	Segmente variabile, diversitate și juxtapuse ale receptorului T celular
	V α , V β	Segmentele regiunii variabile ale receptorilor T celulari maturi în limfocitul infiltrant tumoral predominant

5. MODEL EXPERIMENTAL

5.1 Procesul 2A

5.1.1 **Pre-REP:** la primire, tumoarea se transferă într-un Cabinet de biosecuritate (clasa II, tip A2). Folosind tehnica sterilă, tumoarea se îndepărtează din recipientul de transport și se spală în HBSS conținând 50μg/mL gentamicină. Tehnicianul fragmentează tumoarea în 40 fragmente x 3X3X3mm care se transferă într-un balon G-REX - 100M conținând mediu CM1 preîncălzit suplimentat cu 6000 IU/mL rhIL-2. Balonul se introduce într-un incubator de cultură tisulară umidificat la 37°C, 5% CO₂ 11 zile. Dacă tumoarea generează mai mult de 40 de fragmente, se pot folosi mai multe G-REX -100M. Celulele sunt recoltate și preparate pentru REP.

5.1.2 **REP:** În ziua 11, se prepară un balon G-REX -500M conținând 5L de CM2 suplimentat cu 3000 IU/mL rhIL-2, 30ng/mL anti-CD3 (Clona OKT3) și 5 x 10⁹ celule feeder PBMC alogenice iradiate. TIL recoltate din balonul G-REX -100M pre-REP după reducerea volumului s-au numărat și s-au însămânțat în balonul G-REX -500M la o densitate cuprinsă între 5 × 10⁶ și 200 × 10⁶ celule. Balonul s-a introdus într-un incubator de cultură tisulară umidificat la 37°C, 5% CO₂ timp de cinci zile. În ziua 16, s-a redus volumul balonului G-REX -500M, s-au numărat TIL și s-a determinat viabilitatea. În acest punct, TIL s-au amplificat în baloane G-REX -500M multiple (până la maxim șase baloane), fiecare cu o densitate de însămânțare de 1 × 10⁹ TIL/balon. Toate baloanele s-au introdus în incubatoare de cultură tisulară umidificate la 37°C, 5% CO₂ alte șase zile. În ziua 22, ziua recoltării, s-a redus volumul fiecărui balon cu 90%, celulele au fost colectate și filtrate printr-un filtru sanguin de 170 μm, după care s-au colectat într-o pungă de 3 L Origin EV3000 sau echivalent în vederea spălării automate LOVO.

5.1.3 **Recoltare și compoziție finală:** TIL se spală folosind sistemul de procesare celulară automat LOVO care înlocuiește 99.99% din mediul de cultură celulară cu un tampon de spălare constând din PlasmaLyte-A suplimentat cu 1% HSA. LOVO funcționează folosind tehnologia membranară de filtrare prin centrifugare care recuperează peste 92% din TIL, eliminând practic componentele de cultură tisulară reziduale, inclusiv ser, factori de creștere și citokine, precum și alte reziduuri și particule. După încheierea spălării, se efectuează o numărare a celulelor pentru a determina amplificarea TIL și viabilitatea acestora la recoltare. Se adaugă CS10 în TIL spălate la un raport 1:1 volum:volum pentru a obține compoziția finală a procesului 2A. Produsul preparat final se împarte în părți alicote în pungi de criodepozitare, se etanșează și se introduce în casete de aluminiu prerăcite. Pungile de criodepozitare conținând TIL se congelează folosind un congelator cu rată controlată de îngheț CryoMed (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) conform SOP LAB-018 Rev 000 Funcționarea congelatorului cu rată controlată de îngheț.

5.2 **Probe TIL:** s-au colectat TIL în patru condiții pentru caracterizare comparativă.

5.2.1 TIL recoltate proaspete (direct din PlasmaLyte-A cu 1% tampon spălare HSA), TIL decongelate (direct din pungă de produs final decongelat).

5.2.2 TIL reREP proaspete cu fenotip extins (TIL recoltate proaspete cultivate 7-14 zile cu IL-2, feeder PBMC și anti-CD3 clona OKT3).

5.2.3 TIL decongelate cu fenotip extins (TIL decongelate cultivate 7-14 zile cu IL-2, feeder PBMC și anti-CD3 clona OKT3).

5.3 **Prezentarea testării** (vezi Figura 2)

5.3.1 **Testarea Pre-REP** include evaluarea cantității de IL-2 și analiza metaboliților din cultura celulară cum ar fi glucoză, acid lactic, L-glutamină și amoniac în cursul pre-REP.

5.3.1.1 Cuantificare IL-2: mediul a fost îndepărtat periodic din cultura pre-REP și testat prin ELISA cu privire la cuantificarea IL-2. Trimitere la instrucțiunile producătorului R&D Systems Human IL-2 Quantikine ELISA Kit.

5.3.1.2 Analiza metaboliților din cultura celulară: mediul a fost îndepărtat periodic din cultura pre-REP și testat cu privire la următorii metaboliți: glucoză, acid lactic, L-glutamină și amoniac. Trimitere la manualul Roche Cedex Bioanalyzer pentru instrucțiuni.

5.3.2 **Testarea REP** a inclus teste extinse cum ar fi numărarea celulelor, % viabilitate, analiza citometrică în flux a moleculelor de suprafață celulară, potențial (producție IFN-γ), test de liză redirectionată bioluminescentă, producția de granzimă B, metabolism celular și măsurarea lungimii telomerilor.

5.3.2.1 **Numărarea celulelor și viabilitate:** probele TIL s-au numărat și viabilitatea s-a determinat folosind un aparat automat Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA) conform SOP LAB-003 Rev 000 Cellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counter.

5.3.2.2 **Analiza citometrică în flux a biomarkerilor de suprafață celulară:** probele TIL au fost împărțite în părți alicote pentru analiza citometrică în flux a markerilor de suprafață celulară folosind procedura indicată în WRK LAB-041 Rev 000 Colorarea antigenică de suprafață a TIL post REP.

5.3.2.3 **Test de potențial (producția IFN-γ):** potențialul citotoxic s-a măsurat de asemenea determinând nivelurile de citokine IFN-γ în mediul TIL stimulate cu anticorpi la CD3, CD28 și CD137/4-1BB. Nivelurile

IFN- γ în mediul din aceste TIL stimulate s-au determinat folosind WRK LAB-016 Rev 000 Stimularea TIL pentru măsurarea eliberării IFN- γ .

5.3.2.4 **Test de liză redirecționată bioluminescentă:** potențialul citotoxic al TIL de a liza celulele țintă s-a evaluat folosind un test de co-cultură a TIL cu linia celulară bioluminescentă, P815 (clona G6), conform SOP din WRK LAB-040 testul de liză redirecționată bioluminescentă (test de potențial) pentru TIL.

5.3.2.5 **Producția granzimei B:** Granzima B măsoară de asemenea capacitatea TIL de a distruge celulele țintă. Supernatanții de mediu restimulați așa cum se descrie în 5.2.5.3 s-au evaluat cu privire la nivelurile de Granzima B folosind kitul Human Granzyme B DuoSet ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN) urmând instrucțiunile producătorului.

5.3.2.6 **Metabolismul celular (respirator):** celulele au fost tratate cu inhibitori ai respirației mitocondriale și glicolizei pentru a determina un profil metabolic pentru TIL constând din următoarele măsurători: fosforilare oxidativă de referință (măsurată prin OCR), capacitatea respiratorie de rezervă, activitatea glicolică de referință (măsurată prin ECAR) și rezerva glicolică. Profilurile metabolice s-au realizat folosind procedura din WRK LAB-029 testul de stres mitocondrial/glicolic combinat Seahorse.

5.3.2.7 **Măsurarea lungimii telomerilor:** s-au folosit diferite metode pentru a măsura lungimea telomerilor în ADN genomic și preparate citologice. Analiza fragmentelor de restricție telomerică (TRF) este etalonul de aur al măsurării lungimii telomerilor (de Lange et al., 1990). Totuși, limitarea majoră a TRF este necesitatea unei cantități mari de ADN (1.5 μ g). În prezenta invenției pot fi folosite două tehnici larg utilizate pentru măsurarea lungimii telomerilor, și anume hibridizarea fluorescență in situ (FISH; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) și PCR cantitativă.

5.3.3 S-au prelevat probe suplimentare pentru teste următoare și se pot analiza în viitor, după necesitate:

5.3.3.1 Analiza detaliată a citokinelor.

5.3.3.2 Secvențiere TCR.

6. REZULTATE OBȚINUTE

S-au efectuat în total 9 experimente folosind TIL derivate din tumori descrise în secțiunea 2.3 a modelului experimental și condițiile de recoltare din secțiunea 5.1. TIL recoltate folosind Procesul 2A au fost supuse testării indicate în secțiunea 5.3.2 în scopul înțelegerii capacității lor de amplificare, a viabilității, fenotipului, potențialului citotoxic și profilului metabolic. Toate măsurătorile s-au efectuat pentru TIL recoltate proaspete și TIL înghețate decongelate (Procesul 2A).

6.1 Numărarea celulelor și viabilitate

6.1.1 S-au efectuat numărări la sfârșitul pre-REP, în ziua 5 sau 6 REP (ziua expansiunii) și la sfârșitul REP, înainte de spălarea LOVO și după spălarea LOVO. Numărul celulelor s-a folosit apoi pentru a determina expansiunea TIL în timpul REP și recuperarea TIL după spălarea LOVO. După decongelare, celulele au fost numărate din nou pentru a determina recuperarea post-decongelare (pe baza concentrației la care s-au congelat TIL) și viabilitatea post-decongelare înaintea trecerii la alte teste analitice. Tabelul 3 prezintă toate aceste rezultate pentru cele nouă efectuări ale Procesului 2A.

Tabel 32: Număr celule, % viabilitate și expansiunea TIL din Procesul 2A.

	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Inocul pre-REP	3.3 x 10 ⁷	1 x 10 ⁸	7.5 x 10 ⁷	1.8 x 10 ⁸	4.1 x 10 ⁶	5.4 x 10 ⁶	7 x 10 ⁷	4.7 x 10 ⁷	4.8 x 10 ⁷
Numărare ziua 5/6	1.3 x 10 ⁹	4 x 10 ⁹	3 x 10 ⁹	3.6 x 10 ⁹	6.6 x 10 ⁸	2.8 x 10 ⁹	4.0 x 10 ⁹	3.7 x 10 ⁹	2.2 x 10 ⁹
Nr. de ori expansiune din ziua 0 până în ziua 11	898	590	470	130	1900	522	771	1400	850
Recoltare	2.8 x 10 ¹⁰	5.6 x 10 ¹⁰	3.5 x 10 ¹⁰	2.3 x 10 ¹⁰	7.8 x 10 ⁹	2.63 x 10 ¹⁰	5 x 10 ¹⁰	6.7 x 10 ¹⁰	4.1 x 10 ¹⁰
Recuperare LOVO (%)		68	100	100	92	95	100	90	99

	M1061 T	M1062 T	M1063 T	M1064 T	M1065 T	EP11001 T	M1056 T	M1058 T	M1023 T
Pungi de criodepozitare	3 x 30ml	2 x 100ml	2 x 100ml	2 x 50ml	3 x 100ml	2 x 65ml	2 x 100ml	2 x 100ml	2 x 100ml
Recuperare post-decongelare (%)	103	84	90	88	101	82	82	86	78
Viabilitate post-decongelare (%)	84.75	84.36	77.15	83.48	79.98	74.85	80.28	85.03	89.21

6.1.2 Procesul 2A SOP definește numărul inițial al TIL pentru REP ca un interval de $5\ 200 \times 106$ TIL. Intervalul a nouă probe TIL folosite pentru începerea REP din Procesul 2A a fost de la 4.1×106 (M1065T) - 1.8×108 (M1064T), cu un număr TIL inițial mediu de 6.58×107 . În mod interesant, REP cu plăci cu cel mai mic număr de TIL a amplificat în cel mai mare grad la recoltarea REP (interval de expansiune pentru toate cele 9 REP: 130-1900 de ori; expansiune medie, 840 de ori). Numărul mediu al TIL recoltate la sfârșitul acestor nouă REP din Procesul 2A a fost 4.49×1010 (interval 7.8×109 - 6.7×1010).

6.1.3 Pentru statistica comparativă a procesului 1C, vezi Chemistry, Manufacturing and Controls (CMC) Section of Investigational New Drug (IND) Application for LN144/LN-145.

6.1.4 Procesul 1C utilizează manipularea manuală și centrifugare pentru spălarea produsului TIL. Acestea consumă mult timp, dar, mai important, pot duce la pierdere de până la 25% produs între recoltare și compoziția finală. Sistemul de spălare celulară automat LOVO asigură o modalitate de minimizare a pierderii celulare, precum și o spălare în sistem închis care scade riscul contaminării produsului în timpul etapelor de spălare. Recuperarea produsului după etapa de spălare LOVO a protocolului a prezentat o medie de $93.8 \pm 10.4\%$ recuperare de produs TIL care intră în etapa de spălare. Această statistică include produs TIL pentru M1062T, care a avut o recuperare LOVO de 68%, unde o eroare de operator în operarea LOVO a dus la necesitatea centrifugării probei și apoi a reînceperii procedurii LOVO (vezi secțiunea 7, Abateri și discrepante). Aceasta reprezintă o îmbunătățire foarte favorabilă a etapei de spălare în Procesul 1C în ziua recoltării REP.

6.1.5 Recuperarea TIL după decongelare este de asemenea o problemă majoră pentru un produs TIL congelat. Recuperarea produsului s-a determinat măsurând numărul de celule recuperate din pungă după decongelare comparativ cu numărul de celule introduse în fiecare pungă de congelare înainte de crioconservare. Intervalul de recuperare din decongelare a fost 78 - 103%, cu o recuperare medie de $88.2 \pm 8.6\%$.

6.1.6 Deși există o diferență semnificativă în viabilitatea probelor înainte sau după decongelare, în medie, există o pierdere de doar 2% a viabilității la decongelare. Viabilitatea TIL care intră în crioconservare a fost $84.3 \pm 4.7\%$ și aceleași TIL, după decongelare, au avut o viabilitate de $82.1 \pm 4.4\%$ ($p = 0.0742$, test t Student împerecheat, non-parametric). Criteriile de eliberare pentru produsul TIL clinic proaspăt din Procesul 1C necesită 70% viabilitate. Indiferent de o mică pierdere de viabilitate la decongelare, toate cele 9 runde ale procesului 2A au îndeplinit acest criteriu de eliberare după decongelarea produsului criogenic. Tabelul 4 și Figura 3 indică viabilitatea TIL care intră în crioconservare (proaspete + CS10) și viabilitatea TIL la decongelare.

Tabel 33: Compararea viabilității produsului proaspăt și decongelat.

	M1061 T	M1062 T	M1063 3T	M1064 T	M1065 T	EP11001 T	M1056 T	M1058 T	M1023 T
Proaspăt CS10	88.05	84.45	82.05	86.75	76.35	77.9	84.8	87.5	90.5
Decongelat	84.75	84.36	77.15	83.48	79.98	74.85	80.28	85.03	89.21

6.2 **Expansiunea Re-REP a TIL.** Pe lângă examinarea capacității produsului proaspăt de a se amplifica în REP, s-a evaluat capacitatea TIL atât proaspete, cât și decongelate de a se amplifica la restimulare cu APC

PBMC feeder alogenice iradiate proaspete și anti-CD3 proaspăt. După 7 zile, produsele TIL restimulate s-au analizat cu privire la capacitatea de a se amplifica din condițiile de cultură inițiale. Figura 4 și Tabelul 5 indică expansiunea medie a celulelor TIL re-REP după 7 zile de creștere în cultură. Analiza datelor folosind un test t Student împerecheat arată că această capacitate a TIL de a se amplifica în re-REP nu este diferită semnificativ între inițierea REP cu TIL proaspete sau TIL decongelate ($p = 0.81$).

Tabel 34: Compararea amplificării TIL proaspete și decongelate în cultură re-REP

	M1061 T	M1062 T	M1063 T	M1064 T	M1065 T	EP11001T	M1056 T	M1058 T	M1023 T
Proaspete	139.67	264	227	60.12	24.67	268.83	176	316.33	202.33
Decongelate	177.33	110.33	220.67	177.6	220.2	302.5	114.77	190.67	73.82

6.3 Metaboliți de cultură celulară. Una dintre premisele majore ale Lion 2A a fost că un timp tehnologic mai scurt și transferuri mai puține ar duce la economii de cost și limitează variabilitatea. Posibilele consecințe adverse ar fi creșterea metaboliților indezirabili și scăderi ale surselor de nutrienți. Așa cum se indică în Figura 5, valorile sanguine normale ale electroliților (sodiu și potasiu), nutrienților (glutamina și glucoza) și metaboliților (acid lactic și amoniac) formează un interval de luat în considerare la evaluarea rezultatelor obținute din pre-REP de 11 zile. Așa cum se indică în Figura 6, s-au evaluat trei TIL (M1061T, M1062T și M1064T) succesiv. În această condiție, potasiul și sodiul s-au menținut la valori normale, glucoza a fost la $>1.0\text{g/L}$ și glutamina $> 0.3\text{ mmol/L}$, mult peste valorile sanguine normale inferioare. După cum era de așteptat, lactatul a crescut la 0.8g/L , aproximativ 5X nivelul normal din sânge și amoniacul la 3mmol/L , așa cum era de așteptat din celulele amplificate rapid și de asemenea în mare măsură mai mari decât nivelul normal din sânge.

6.4 Cuantificarea IL-2.

6.4.1 Principalul activator al proliferării TIL în pre-REP, pe lângă glucoza suplimentară, glutamina și oxigenarea suficientă, este prevederea unor niveluri ridicate de rhIL-2. După adăugare în mediu conținând ser, nivelurile IL-2 s-au măsurat la $2-3.5 \times 10^3$ IU/ml, scăzând până la circa 1.0×10^3 IU/ml în cele 11 zile de cultură. Acest nivel a fost mult peste cele 30-100 IU/ml necesare pentru a susține proliferarea celulelor T. Evaluarea concentrațiilor IL-2 folosind diferite surse de IL-2 (Prometheus, Akron, Cellgenix) se efectuează în prezent în experimente separate (QP-17-010 : Calificarea IL-2 de la Cellgenix, Akron și Prometheus) la Lion Biotechnologies, Tampa.

6.5 Producția IFN- γ

6.5.1 După stimulare 24h a TIL cu sfere Dynabeads anti-CD3, CD28 și 4-1BB magnetice, așa cum se descrie în secțiunile 5.3.5.3, supernatantul din culturi s-a colectat și s-a analizat cu privire la IFN- γ folosind kituri ELISA. Toate TIL restimulate au produs mai mult IFN- γ decât omologii lor nestimulați, indicând că stimularea TIL a dus la activarea acestora. Figura 8 arată capacitatea celor patru compoziții TIL diferite (TIL proaspete, decongelate, re-REP proaspete și re-REP decongelate) testate de a elibera IFN- γ în mediu înconjurător la restimulare.

Tabelele 6 și 7 indică valorile medii ale secreției IFN- γ în cele 9 runde ale Procesului 2A. Secreția IFN- γ în mediul înconjurător la restimulare nu diferă între TIL proaspete și TIL crioconservate, decongelate. Tabelul 6 arată că produsul proaspăt a avut o medie de 4143 ± 2285 pg IFN- γ /106 TIL, în timp ce produsul decongelat a avut 3910 ± 1487 pg IFN- γ /106 TIL ($p = 0.55$ folosind test t Student împerecheat). Dacă se normalizează la produsul TIL total (Tabel 7), în medie, TIL stimulate proaspete au produs 86 ± 61 grame IFN- γ , iar TIL stimulate decongelate au produs 68 ± 40 grame IFN- γ ($p = 0.13$). Aceste constatări arată că atât TIL proaspete, cât și decongelate produc IFN- γ și nu există nici o diferență a capacității TIL proaspete sau decongelate de a produce IFN- γ la stimulare cu anti-CD3/anti-CD28/anti-4-1BB.

Tabel 35: Secreția IFN- γ în TIL proaspete și decongelate (exprimată ca pg/10⁶celule/24h)

	M1061 T	M1062 T	M1063 T	M1064 T	M1065 T	EP11001 T	M1056 T	M1058 T	M1023 T
Proaspete	4570	3921	5589	619	1363	4263	6065	2983	7918
Decongelate	3158	3543	5478	1563	2127	5059	4216	4033	6010
Re-REP proaspete	3638	1732	971	2676	2753	1461	2374	770	3512

	M1061 T	M1062 T	M1063 T	M1064 T	M1065 T	EP11001 T	M1056 T	M1058 T	M1023 T
Re-REP decongelate	2970	2060	1273	1074	1744	2522	5042	4038	923

Tabel 36: Secreția IFN- γ în TIL proaspete și decongelate. Toate valorile sunt în 1012 (exprimate ca grame/10⁶ celule/24h)

	M1061 T	M1062 T	M1063 T	M1064 T	M1065 T	EP11001 T	M1056 T	M1058 T	M1023 T
Proaspete	67.1	78.4	99.6	8.4	4.8	66.1	157.0	109.0	187.0
Decongelate	47.7	59.7	87.9	18.7	7.5	64.4	88.9	127.0	111.0

5 6.6 Producția granzimee B

6.6.1 TIL au fost stimulate cu sfere Dynabeads anti-CD3, CD28 și 4-1BB magnetice 24h așa cum se descrie în 5.2.5.3 și supernatantul din culturi s-a colectat după 24h și s-a analizat cu privire la nivelurile granzima B prin ELISA. Toate TIL restimulate au produs mai multă granzimă B decât omologii lor nestimulați, indicând că stimularea TIL a dus la activarea acestora. Figura 9 arată capacitatea TIL proaspete, TIL re-REP proaspete și TIL re-REP decongelate de a elibera granzima B în mediul înconjurător la restimulare cu amestecul de citokine.

10 Toate produsele au prezentat producție de granzimă B între 9190 pg/10⁶ celule viabile și 262000pg/10⁶ celule viabile (Tabel 8). Tabelul 6 arată că produsul proaspăt a avut o medie de 60644 + 42959, iar re-REP proaspete și decongelate au produs 93600 + 67558, respectiv 103878 + 84515. 15 Compararea între re-REP proaspete și re-REP decongelate a arătat că nu există nici o diferență a capacității TIL obținute din oricare condiții (p = 0.7). Din cauza lipsei măsurătorii granzimei B în produsul decongelat, nu s-a efectuat analiză statistică folosind TIL proaspete.

20 **Tabel 37: Secreția de granzimă B în TIL proaspete, TIL reREP proaspete și TIL reREP decongelate (exprimată ca pg/10⁶celule/24h)**

	M1061 T	M1062 T	M1063 T	M1064 T	M1065 T	EP11001 T	M1056 T	M1058 T	M1023 T
Proaspete	10600	108000	49100	28400	24300	17900	120000	12900	79100
ReREP proaspete	216000	37700	42400	91800	192000	22200	97300	73800	69200
ReREP decongelate	262000	113000	35100	65600	48700	9190	147000	201000	53300

6.7 Analiza citometrică în flux a biomarkerilor de suprafață celulară

25 Profilarea fenotipică TIL: patru grupuri de anticorpi au fost standardizate la LION pentru caracterizarea largă a profilului funcțional al celulelor T. Aceste grupuri s-au folosit pentru a evalua imunofenotiparea TIL proaspete, TIL decongelate, TIL re-REP proaspete și TIL re-REP decongelate. Toate datele folosite pentru reprezentarea grafică în această secțiune sunt indicate și în format de tabel (Tabele 14-24) în secțiunea anexă 10.

6.8 Test de liză redirecționată bioluminescentă

30 6.8.1 Pentru a determina capacitatea posibilă a TIL din Procesul 2A de a distruge celulele tumorale țintă, am dezvoltat un test care presupune co-cultura TIL cu o linie celulară țintă surrogat bioluminescentă P815, așa cum se descrie în secțiunea 5.3.2.4. O co-cultură de 4h a diferitelor compoziții TIL cu P815 în prezența stimulării anti-CD3 indică o măsură a potențialului citotoxic al celulelor TIL exprimat ca LU50, unități litice care pot fi definite ca numărul de TIL necesar pentru a distruge 50% din celulele țintă. Această măsură este exprimată apoi ca LU50/106 TIL. Figura 32 de mai jos indică potențialul citotoxic al TIL din produsul proaspăt și din cele două condiții TIL re-REP, re-REP proaspete și re-REP decongelate. 35 6.8.2 Compararea re-REP proaspete cu re-REP decongelate arată că nu există diferență semnificativă în capacitatea oricăror TIL de a distruge o celulă țintă (p = 0.3126). Aceste date susțin concluzia că nu există

nici o diferență între produsul proaspăt și decongelat cu privire la potențialul citotoxic al produsului TIL. Nu s-a efectuat comparare între produsele proaspete fiindcă potențialul citotoxic nu s-a măsurat imediat după decongelarea TIL. Tabelul 9 indică unitățile litice ale TIL necesare pentru a distruge 50% din linia celulară țintă P815.

5

Tabel 38: Unități litice produse de TIL împotriva liniei celulare țintă P815

	Proaspete	reREP proaspete	reREP decongelate
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 ± sd	26.8 ± 22.5	20.6 ± 13.3	31.1 ± 37.6

6.9 Profilul metabolismului celular al TIL

10 6.9.1 Pentru a evalua sănătatea metabolică a TIL post-REP, am utilizat instrumentele de analiză Seahorse
(XFP și XFe96) de la Agilent Technologies (Santa Clara, CA) urmând protocolul indicat în secțiunea
5.3.2.6. Pe scurt, prin tratarea celulelor cu inhibitori care țintesc anumite aspecte ale fosforilării oxidative
sau glicolizei, celulele sunt stresate astfel încât să permită determinarea SRC și a rezervei glicolitice. În
15 plus, se pot determina nivelurile de bază pentru fosforilarea oxidativă (OCR de bază) și glicoliză (ECAR
de bază). În sfârșit, fiindcă inhibitorii fosforilării oxidative și glicolizei se combină în același test, se poate
distinge o posibilă rezervă ascunsă de SRC, vizibilă numai când celulele sunt tratate cu inhibitorul
competitiv al glicolizei, 2-deoxiglucoza (2-DG), (etichetat SRC2DG), rezultând o creștere a SRC care altfel
ar rămâne ascunsă. Această capacitate respiratorie suplimentară a fost etichetată SRC"ascunsă". Tabelul 9
20 indică profilurile metabolice ale TIL recoltate proaspete, TIL re-REP proaspete și TIL re-REP decongelate
obținute din testul de stres metabolic efectuat pe celule.

6.9.2 **Figurile 55A - F** indică datele din Tabelul 38 în formă grafică. Produsul REP recoltat proaspăt
prezintă unele diferențe statistice față de re-REP proaspete și re-REP decongelate. Acest lucru nu este
surprinzător fiindcă produsul re-REP a fost restimulat cu APC PBMC iradiate proaspete și anticorp anti-
25 CD3 proaspăt imediat după REP sau la decongelare. Totuși, în toate cazurile, nu există diferență
semnificativă între produsele proaspete și decongelate când sunt ambele restimulate într-o procedură re-
REP (vezi valorile p din tabelul 9). Aceasta arată că procesul de crioconservare nu dăunează produsului
TIL. Cel mai remarcabil, pentru fosforilarea oxidativă, produsele re-REP au SRC mai mare decât produsele
REP recoltate proaspete omoloage. Pentru glicoliză, TIL re-REP au niveluri de bază statistic semnificativ
30 mai mari de glicoliză și, invers, niveluri statistic mai mici ale rezervei glicolitice decât produsul REP
proaspăt. Se menționează că acest lucru ar putea indica faptul că TIL re-REP sunt mai activate decât TIL
recoltate proaspete, TIL sănătoase, activate, prezentând niveluri mai mari de activitate glicolitică (Buck et
al., JEM 212:1345-1360; 2015).

Tabel 39: Profilul metabolic al TIL din procesul 2A

OCR de bază, pmol/min	M1061	M1062	M1063	Moff2	Moff3	Moff4	EP11001			medie	sd	v. p re- REP	
							T	M1064	M1065			v. p proas pete	proas pete
PLLA	50.33	33.95	74.89	36.80	38.48	39.89	63.02		55.89	49.16	14.56		
re-REP proaspete	38.92	38.48	54.35	25.98	18.68	38.61	37.33	41.04		36.67	10.57	0.03	
re-REP decongelate	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 evident, 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 proaspete	51.72	36.46	48.24	28.34	37.69	21.02	9.93	99.71		41.64	27.17	0.29	
re-REP decongelate	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 proaspete	81.80	78.82	52.73	38.69	92.37	42.35	-12.81	137.15		63.89	44.45	0.08	
re-REP decongelate	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 ascuns, pmol/min													
PLLA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		17.68	2.21	6.25		
re-REP proaspete	30.08	42.36	4.50	10.35	54.68	21.33	0.00	2.63		20.74	20.13	0.02	
re-REP decongelate	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 de baza, mpH/min													
PLLA	53.44	27.55	136.33	48.72	89.80	62.29	108.38		72.07	74.82	35.20		
re-REP proaspete	96.48	96.63	171.47	102.87	145.19	153.97	35.60	147.02		118.65	44.19	0.10	
re-REP decongelate	143.35	173.93	193.39	149.19	169.21	73.17	98.64	96.37	90.55	131.98	43.15	0.01	0.38
Rezerva glicolitică, mpH/min													
PLLA	32.11	26.18	52.00	19.09	38.01	39.03	43.14		76.43	40.75	17.61		
re-REP proaspete	24.06	8.75	18.17	-8.28	-5.89	10.31	35.34	20.80		12.91	14.85	0.003	
re-REP decongelate	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 O comparație directă între produsele proaspete și congelate folosind procedura re-REP a permis să se determine că produsul TIL atât proaspăt, cât și congelat, în condiții identice de stimulare, obțin profiluri metabolice statistic indistincte. TIL re-REP proaspete și re-REP decongelate au niveluri similare de respirație bazală (Figura 60A, 36.7 ± 10.6 și 44.8 ± 12.9 pmol/min; $p = 0.11$), precum și SRC (evident) similar (Figura 60B, 41.6 ± 27.2 și 62.7 ± 30.8 ; $p = 0.12$). La tratarea acestor celule re-REP cu 2-DG, inhibitorul competitiv cu glucoza, care duce la o inhibare a glicolizei, vedem că ambele TIL re-REP proaspete și decongelate prezintă o capacitate respiratorie de rezervă suplimentară, "ascunsă" (SRC2DG; SRC ascuns) care este în mare parte mică sau absentă în proba de TIL recoltate proaspete (Figura 60C); numai o probă a avut niveluri mari de SRC2DG (Figura 60C) în TIL recoltate proaspete, și invers, numai una din șapte probe testate au prezentat o lipsă de SRC ascuns la re-REP. SRC ascuns (Figura 60D) pentru re-REP proaspete a reprezentat o medie de 20.7 ± 20.1 , iar SRC ascuns (Figura 60D) pentru re-REP decongelate a fost de 27.8 ± 16.1 ; $p = 0.52$).

6.9.4 Indicația metabolică cea mai remarcabilă a TIL cu fenotip ascuns (re-REP) sunt nivelurile constant mari ale glicolizei de bază pentru probele cu fenotip ascuns (re-REP). Glicoliza de bază (Figura 60E) este constant mare în probele re-REP, cu o medie de 118.7 ± 44.2 mpH/min în re-REP proaspete și 132.0 ± 43.2 mpH/min în re-REP decongelate. Aceste probe nu diferă statistic între ele ($p = 0.38$). Totuși, după cum s-a menționat mai sus, proba recoltată proaspăt nu prezintă astfel de niveluri mari de glicoliză de bază. Comparativ cu TIL re-REP proaspete, această diferență este substanțială, dar nesemnificativă ($p = 0.10$); totuși, comparativ cu probele re-REP decongelate, diferența este semnificativă ($p = 0.01$). Aceste celule re-REP se bazează aparent în mare măsură pe glicoliză pentru cerințele lor energetice, fiindcă au rezervă glicolitică mică rămasă când sunt stresate în testele metabolice Seahorse (Figura 60F): TIL re-REP proaspete au o medie de 12.9 ± 14.9 mpH/min; TIL re-REP decongelate, 3.35 ± 23.8 mpH/min. Aceste re-REP nu sunt diferite între ele ($p = 0.47$), dar ambele sunt statistic diferite de rezerva glicolitică din probele TIL recoltate proaspete, cu medie de 40.8 ± 17.6 mpH/min ($p = 0.003$ și 0.01 comparativ cu re-REP proaspete și TIL re-REP decongelate). Ar trebui efectuate alte studii pentru a determina cauza diferențelor observate cu privire la glicoliză între aceste probe TIL recoltate proaspete și TIL.

6.10 Măsurarea lungimii telomerilor

6.10.1 Măsurarea lungimii telomerilor TIL post REP prin Flow Fish și qPCR.

6.10.1.1 Flow-FISH s-a efectuat folosind Dako/Agilent Pathology Solutions (Telomere PNA Kit/FITC pentru citometrie în flux) și s-au urmat instrucțiunile producătorului pentru a măsura lungimea medie a repetiției telomerice. S-a folosit linia celulară leucemică T 1301 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ca standard de referință intern în fiecare test. TIL individuale au fost numărate și amestecate cu celule 1301 la un raport celular 1:1. 2 X 10⁶ TIL s-au amestecat cu 2 X 10⁶ celule 1301. Hibridizarea in situ s-a efectuat în soluție de hibridizare (70% formamidă, 1% BSA, 20mM Tris, pH 7.0) în duplicat și în prezența și în absența unei sonde Telomere PNA conjugate cu FITC (FITC-00-CCCTAA-CCC-TAA-CCC-TAA) complementară cu secvența repetiției telomerice la o concentrație finală de 60nM. După adăugarea sondei Telomere PNA, celulele s-au incubat 10 minute la 82°C într-un bloc termic. Celulele au fost așezate în întuneric la temperatura camerei peste noapte. Dimineata următoare, s-a îndepărtat surplusul de sondă prin spălare de 2 ori câte 10 minute într-un bloc termic la 40°C cu soluție de spălare. După spălări, s-a adăugat DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA) la o concentrație finală de 75ng/ml. S-a folosit colorarea ADN cu DAPI pentru activarea celulelor în populația G0/G1. Analiza probelor s-a efectuat folosind un citometru în flux Yeti (Propel-Labs, Fort Collins, CO). Fluorescența telomerilor din proba testată a fost exprimată ca un procentaj al fluorescenței (fl) celulelor 1301 conform următoarei formule: lungimea relativă a telomerilor = [(FITC fl medie celule testate cu sondă- FITC fl medie celule testate fără sondă) x indice ADN al celulelor 1301 x 100] / [(FITC fl medie celule 1301 fără sondă-FITC fl medie celule 1301 fără sondă) x indice ADN al celulelor testate.

6.10.1.2 qPCR: s-a folosit qPCR în timp real pentru a măsura lungimea relativă a telomerilor. Pe scurt, s-a determinat raportul dintre numărul copiilor repetițiilor telomerice și numărul copiilor genice individuale (T/S) folosind un ciclor termic BioRad PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) într-un format cu 96 de godeuri. S-au folosit zece nanograme de ADN genomic pentru reacția PCR a telomerilor (Tel) sau hemoglobinei (hgb) și primerii utilizați au fost: primer Tel-1b (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), primer Tel-2b (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT), primer hgb1 (GCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC) și primer hgb2 (CACCAACTTCATCCACGTTCCACC). Toate probele s-au analizat prin reacții telomerice și hemoglobinic și analiza s-a efectuat în triplicat pe aceeași placă. Pe lângă probele testate, fiecare placă cu 96 de godeuri a conținut o curbă standard în cinci puncte de la 0.08 ng la 250 ng folosind ADN genomic izolat din celule 1301. Raportul T/S (-dCt) pentru fiecare probă s-a calculat scăzând valoarea ciclului prag hemoglobinic median (Ct) din valoarea Ct telomeric median. Raportul T/S relativ (-ddCt) s-a determinat scăzând raportul T/S al punctului curbei standard 10 ng din raportul T/S al fiecărei probe necunoscute.

6.10.1.3 **Lungimea telomerilor, rezultate și discuție:** telomerii sunt secvențe cap (secvențe nucleotidice repetitive) la capătul cromozomilor liniari care au un rol esențial în facilitarea replicării cromozomiale complete. Măsurarea telomerilor este un instrument din ce în ce mai proeminent în studiul afecțiunilor cum ar fi boli degenerative, cancer și îmbătrânire. Studiile anterioare de la NIH (J Immunol. 2005, Nov 15;175(10):7046-52; Clin Cancer Res. 2011, Jul 1; 17(13): 4550- 4557) au arătat că lungimea mai mare a telomerilor TIL este asociată cu răspuns clinic. Invers, grupul Radvanyi nu a găsit nici o diferență semnificativă a lungimii telomerilor TIL între subiecții cu răspuns și fără răspuns (Clin Cancer Res; 18(24); 6758-70). Nu există până acum dovezi că lungimea telomerilor este asociată cu durata culturii celulelor T in vitro. Este posibil ca TIL post-REP cultivate prin Procesul 2A (cultură de 22 de zile) să aibă lungime mai mare a telomerilor comparativ cu TIL cultivate prin procesul 1C (cultură de 25-36 zile).

7. DISCREPANȚE ȘI ABATERI

7.1 Abateri

- 7.1.1 M1061T: celulele REP s-au împărțit în ziua 6 în 4 baloane G-Rex500M.
- 7.1.2 M1062T: celulele REP s-au împărțit în ziua 6 în 4 baloane G-Rex500M. Din cauza unei erori a operatorului în sistemul de filtrare LOVO, a avut loc o oprire de urgență în timpul procedurii, fiind nevoie de o colectare manuală a TIL din kitul consumabil. TIL au fost filtrate cu succes în timpul unei a doua runde LOVO.
- 7.1.3 M1063T: fără abateri M1064T: fără abateri.
- 7.1.4 M1065T: celulele pre-REP au fost sub specificație pentru numărul de celule în ziua 11 (<5 x 106 celule), dar au continuat în REP. În ziua 6 REP, celulele au fost numărate și reintroduse în G-Rex500M și s-au introdus 4.5L de mediu proaspăt. TIL nu s-au amplificat în această zi din cauza numărului insuficient (<1 x 109 celule în ziua 6 REP).
- 7.1.5 EP11001T: fără abateri.
- 7.1.6 M1056T: celulele pre-REP s-au cultivat la LION într-un balon G-Rex 100 până la 21 de zile. Fragmentele tumorale au fost filtrate în ziua 11 pre-REP și TIL au fost congelate în ziua recoltării în 100% CS10 la 30 x 106 celule per fiolă de 1.5 ml. TIL congelate au fost decongelate la Moffitt PD în CM1 suplimentat cu 6000 IU/mL rhIL-2 și lăsate 3 zile înaintea zilei 0 a REP. În ziua 6 REP, TIL au fost amplificate în 4 baloane cu recoltare în ziua 11 REP.
- 7.1.7 M1058T: celulele pre-REP s-au cultivat la LION într-un balon G-Rex 100 până la 21 de zile. Fragmentele tumorale au fost filtrate în ziua 11 pre-REP și TIL au fost congelate în ziua recoltării în 100% CS10 la 30 x 106 celule per fiolă de 1.5 ml. TIL congelate au fost decongelate la Moffitt PD în CM1 suplimentat cu 6000 IU/mL rhIL-2 și lăsate 3 zile înaintea zilei 0 a REP. În ziua 6 REP, celulele s-au împărțit în 4 baloane cu recoltare în ziua 11 REP.
- 7.1.8 M1023T: celulele pre-REP s-au cultivat la LION în baloane G-Rex10 până la 21 de zile. Fragmentele tumorale au fost filtrate în ziua 11 pre-REP și TIL au fost congelate în ziua recoltării în 100% CS10 la 30 x 106 celule per fiolă de 1.5 ml. TIL congelate au fost decongelate la Moffitt PD în CM1 suplimentat cu 6000 IU/mL rhIL-2 și lăsate 3 zile înaintea zilei 0 a REP. În ziua 6 REP, celulele au fost amplificate în 4 baloane cu recoltare în ziua 11 REP.

7.2 Abateri de testare

7.2.1 Analiza detaliată a citokinelor și secvențierea TCR nu s-au efectuat

8. CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

- 8.1 **Dezvoltarea unui proces mai fiabil.** Provocarea Lion a fost de a transforma Procesul 1C Lion anterior, care a avut un timp de procesare mai îndelungat, într-un Proces 2A Lion posibil mai comercial, care utilizează rafinări ducând la timp de procesare mai scurt și o compoziție finală crioconservată a produsului TIL. În acest scop, s-au efectuat nouă runde de dezvoltare a procesului pentru a confirma că procesul nou și cel vechi demonstrează randamente celulare comparabile și potențial și fenotip TIL comparabile. S-a remarcat complexitatea mult scăzută a întregului proces, ducând la o reducere de 50% a duratei totale a proceselor pre-REP și REP, având în continuare ca rezultat randamente TIL comparabile (7.8 x 109 - 67 x 109 celule) față de Procesul 1C Lion aplicat în prezent la producătorul nostru contractual. Acesta a fost actualizat recent pentru prezentarea ASCO din iunie 2017 (medie: 41.04 x 109 celule cu un interval de 1.2-96 x 109 celule). În plus, Lion a dezvoltat cu succes un produs TIL crioconservat care a demonstrat o recuperare post-decongelare de 78-103% cu > 70% viabilitate TIL, în conformitate cu criteriile de eliberare curente ale Procesului 1C (vezi tabelul 2).
- 8.2 **Rolul analizei fenotipice extinse (Re-REP).** Capacitatea de proliferare în răspuns la stimulare mitogenică (la fel ca în re-REP experimentale prezentate în acest raport) este un atribut calitativ critic al TIL. Experimentele prezentate aici arată că 8/9 TIL decongelate s-au amplificat >100 ori într-o săptămână comparativ cu 7/9 TIL proaspete omoloage, susținând comparabilitatea TIL decongelate cu TIL proaspete (tabel 2). Alte două atribute calitative critice ale TIL sunt capacitatea de a elibera IFN- γ și/sau Granzima B după stimulare cu citokine (CD3/CD28/4-1BB). Stimularea cu citokine a produsului atât proaspăt, cât și

decongelat a dus la eliberare IFN- γ care depășește $2\text{ng}/10^6$ celule/24 ore în 7/9 produse proaspete și toate produsele decongelate (Figura 35) (vezi secțiunea 6.2 a acestui raport). Eliberarea Granzimei B (Figura 36) s-a observat în toate cele 9 runde ale procesului. Nivelurile CD4 și CD8 (Figura 39 și Figura 40) au demonstrat constanță internă remarcabilă între TIL proaspete și decongelate. În plus, analiza capacității TIL de a distruge o linie celulară țintă tumorală surrogat (P815, Figura 59) a arătat că TIL proaspete și decongelate au prezentat potențial citotoxic similar.

8.3 Un test al stresului metabolic al TIL indică bioenergetică solidă. O analiză a profilurilor metabolice ale TIL proaspete și decongelate stimulate în re-REP a demonstrat că TIL proaspete și decongelate au răspuns ambele în mod similar la testarea de stres metabolic și nu au prezentat diferențe substanțiale într-un grup de caracteristici metabolice (tabel 39). Astfel, TIL crioconservate din Procesul 2A pot fi considerate comparabile cu produsul proaspăt din Procesul 1C pe baza celor patru atribute calitative de omologie, potențial, număr de celule și viabilitate prezentate în acest raport. Testele care compară celulele proaspete și decongelate sunt destul de comparabile în fiecare analiză indicată în acest raport.

8.4 Criterii de aprobare: eterogeneitatea intrinsecă a produselor TIL cu terapie personalizată pentru fiecare pacient reflectă: (1) moleculele unice de restricție a complexului major de histocompatibilitate (produșii genici cei mai polimorfi din biologia umană); (2) traiectoria evolutivă unică a tumorilor individuale care apar în micromediul tumoral cu instabilitate genomică și mutațiile de activare și pasagere individuale unice; și (3) eterogeneitatea conferită de variația alelică, diversitatea regiunilor N și reordonările VDJ în segmentele Va și V β care definesc receptorii T celulari folosiți pentru recunoașterea neoepitopilor împart antigene tumorale testiculare și produși codificați viral. Evaluarea variației suplimentare care apare în urma modificărilor procesului este astfel o activitate dificilă și necesită evaluarea a cât mai multor parametri posibil pentru a asigura o 'comparabilitate' a unui material intrinsec eterogen. Aceasta s-a realizat prin examinarea exactă a mai multor criterii de aprobare pentru fezabilitate și comparabilitate, așa cum se detaliază în tabelul 40 de mai jos.

Tabel 40: Criterii de aprobare pentru fezabilitate și comparabilitate

Punct prelevare	Parametru	Metoda de testare	Criterii de aprobare pentru fezabilitate	Criterii de aprobare pentru comparabilitate
	Celule viabile totale	Aparat numărare automat cu AOPI	$\geq 1.5 \times 10^9$ celule viabile	Nici o semnificație statistică între ReREP proaspete și congelate (valoare-p<0.05)
	% Viabilitate	Aparat numărare automat cu AOPI	$\geq 70\%$ viabile	Nici o semnificație statistică între ReREP proaspete și congelate (valoare-p<0.05)
	Puritate	Citometrie în flux	$\geq 90\%$ celule T	Nici o semnificație statistică între ReREP proaspete și congelate (valoare-p<0.05)
		Secvențiere TCR	N/A	N/A
	Potențial	IFNI(ELISA	$\geq 2 \times$ fond și $\geq 400\text{pg}/1 \times 10^6$ celule viabile/24h	Nici o semnificație statistică între ReREP proaspete și congelate (valoare-p<0.05)
		Granzima B ELISA	$\geq 2 \times$ fond	N/A
		Test de liză redirecționată bioluminescentă	N/A	N/A
	Respirație	Test de stres Seahorse	N/A	N/A

Pe baza criteriilor de fiabilitate indicate în Tabelul 11, TIL se vor evalua cu privire la îndeplinirea cerințelor. Toate criteriile individuale au fost îndeplinite pentru fiecare experiment și fiecare linie TIL (n=9). S-a folosit testul t Student pentru analiza statistică. S-a folosit testul t Student non-parametric pentru a calcula valoarea-p pentru % de viabilitate, măsurătorile viabilității nefiind o distribuție Gauss. Vezi tabelul 41 de mai jos.

Tabel 41: Îndeplinirea criteriilor de fezabilitate.

Linie TIL	Număr celule		% Viabilitate		Puritate (citometrie în flux)		Potențial (IFNy ELISA) pg/1x x10 ⁶ celule/24h	
	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
M1061T	6.48x10 ⁹	6.66x10 ⁹	88.05	84.93	95.3	91.5	4570	3158
M1062T	6.76x10 ⁹	5.70x10 ⁹	84.45	83.73	99.7	98.9	3921	3543
M1063T	14.9x10 ⁹	13.5x10 ⁹	82.05	77.15	98.7	99.6	5589	5478
M1064T	8.06x10 ⁹	7.08x10 ⁹	86.75	83.36	84.5	89.8	619	1563
M1065T	3.06x10 ⁹	3.10x10 ⁹	76.35	80.90	96.8	91.4	1363	2127
EP11001T	14.9x10 ⁹	12.2x10 ⁹	77.9	74.85	90.4	94.3	4263	5059
M1056T	13.1x10 ⁹	10.7x10 ⁹	84.8	80.20	94.2	94.1	6065	4216
M1058T	23.4x10 ⁹	20.1x10 ⁹	87.5	85.07	99	96.2	2983	4033
M1023T	18.4x10 ⁹	144x10 ⁹	90.5	89.52	96.5	98.8	7918	6010
Valoare P	0.1132		0.0742		0.9855		0.5821	
Semnificativ diferite	Nu		Nu		Nu		Nu	

Pe baza criteriilor de aprobare indicate în Tabelul 40, TIL re-REP proaspete și congelate s-au evaluat cu privire la îndeplinirea cerințelor. (Viabilitate neraportată fiindcă durata re-REP a fost 7 zile și PBMC iradiate reziduale nu au putut fi distinse de TIL.) Numărul din paranteze indică criteriile care nu au fost îndeplinite. Pe baza criteriilor de puritate măsurate folosind expresia CD3+, 6/9 TIL re-REP proaspete au îndeplinit criteriile stringente >90% (M1061, M1065 și EP11001 nu le-au îndeplinit) și 8/9 produse decongelate au trecut criteriile de aprobare chiar și după Re-REP. numărul mic al TIL CD3+ în EP11001T re-REP proaspete poate fi atribuit scăderii extreme a receptorului T celular. Măsurarea TIL CD3+ cu privire la puritatea nu s-a determinat pentru TIL re-REP decongelate M1023T. Pentru această compoziție TIL, puritatea a fost estimată folosind colorarea TCRap și este indicată de un asterisc (*). S-a folosit testul t Student pentru analiza statistică. Vezi tabelul 42 de mai jos.

15 Tabel 42: Îndeplinirea criteriilor de comparabilitate.

Linie TIL	Număr celule		Puritate (citometrie în flux)		Potențial (IFNy ELISA) pg/1x10 ⁶ celule/24h	
	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
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
Valoare P	0.6815		0.3369		0.7680	
Semnificativ diferite	Nu		Nu		Nu	

Bibliografie

- 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.
- 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. Jin J, Sabatino M, Somerville R, Wilson JR, Dudley ME, Stroncek DF, Rosenberg SA. Simplified method 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.
- 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 Apr 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 Aug;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 Jan 5;79:7.47.1-7.47.10. doi: 10.1002/cpcy.11. PubMed PMID 28055115
- Kelesidis T, Schmid I. Assessment of Telomere Length, Phenotype, and DNA Content. *Curr Protoc Cytom*. 2017 Jan 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 Dec 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 Aug;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 Jan;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 Jan 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 Jan 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 Apr 12;91(8):2882-5. Review. PubMed PMID: 8159672; PubMed Central PMCID: PMC43476.

5 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. Alte tabele

10

Tabel 43 - Figura 39: celule CD4+

ID tumoare	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
Proaspete	4.85	34	10.5	41.7	64.9	64.7	4.15	12.3	8.38
Decongelate	5.68	33	11.3	49.5	61.7	62.6	3.46	17.9	7.6
ReREP proaspete	8.1	23.5	19.2	39/	31.9	16.3	6.46	12.9	16.7
ReREP decongelate	11	33	15.3	49.3	39.3	26.7	9.51	17.2	19.1

Tabel 44 - Figura 40: celule CD8+

ID tumoare	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
Proaspete	45.6	54.7	85.8	38.2	28.6	22.3	93.2	84	88.8
Decongelate	50.8	55.7	76.7	37	22.8	19	92.9	76.6	84.3
ReREP proaspete	63	48.3	72.4	37.9	47.8	5.87	90.3	74.5	74.4
ReREP decongelate	66.3	46.7	47	21.6	19.1	9.23	82.8	63.7	64.3

Tabel 45 - Figura 41: celule CD4+CD154+ și Figura 105: celule CD8+CD154+

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	CD154+	78.6	nd	nd	nd	93.3	62.1	94	76.2
CD8	CD154+	37.3	nd	nd	nd	85.8	19.9	89.3	61.1

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	CD154+	88.9	84	56	82.1	68.2	93.6	97	90.3
CD8	CD154+	35.6	49	12.5	19	59.1	77.88	0.025	90.1

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	CD154+	91	87.2	79.1	83.1	89.3	92	90.1	92.6	77.9	66.9
CD8	CD154+	17	20.3	40	36.9	23	27.6	40.5	52.1	17.9	13.7

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	CD154+	0	91.6	52.1	87.1	77	86.4	92.7	85.1	90.7	81.3
CD8	CD154+	0.00609	61.8	45.3	74.8	47.3	81.7	73.6	78.3	24.2	27.1

Tabel 46 - Figura 43: celule CD4+CD69+ și Figura 17: celule CD8+CD69+

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	CD69+	33.9	nd	nd	nd	82.2	68.8	51.3	84.8
CD8	CD69+	22.4	nd	nd	nd	83	78.3	67.8	78.6

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064			
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate		
Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064			
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate		
CD4	CD69+	58.7	69.6	67.6	77.6	77.6	86.7	85.5	78.5		
CD8	CD69+	80.9	80	62.7	73.2	87.6	87.9	92.2	88.3		
Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	CD69+	82.7	84.4	78.7	58.3	83.9	84.9	89.7	644.6	33.8	38.7
CD8	CD69+	78.9	72.3	69.5	54.5	80.3	86	68	77.8	41.3	48.8
Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	CD69+	90.2	93.2	74.7	39.1	96.1	93.8	91.1	93.7	35.3	80.1
CD8	CD69+	91.3	90.5	87.6	52.9	95.4	94.2	93.1	93.6	71.1	88.1

Tabel 47 - Figura 45: celule CD4+CD137+ și Figura 19 celule CD8+CD137+

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	CD137+	19.8	nd	nd	nd	65.4	30.4	nd	1.31
CD8	CD137+	19.8	nd	nd	nd	65.4	30.4	nd	1.31
Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063			M1064	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate		Proaspete	Decongelate
CD4	CD137+	15.4	30.4	73	78.1	62.6	53.2	51.6	64.7	
CD8	CD137+	28.8	43.1	39.3	35.3	84.4	85.7	71.1	81	

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M11203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	CD137+	524	7.26	7.78	5.4	4.28	3.65	6.89	4.6	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

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 11203	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate Decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	CD137+	31.1	24.6	65.1	47.8	221	18.6	61.6	56.9	49.8	50.8
CD8	CD137+	50.9	33.8	57.3	54.6	77.3	78.8	76.9	87	58	50.3

Tabel 48 - Figura 47: celule CD4+CM și Figura 21 celule CD8+CM

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	CM	1.08	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	0.66	73.2	0.13

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
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

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064			
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate		
Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	CM	0.42	0.53	0.48	1.17	1.83	1.5	1.36	1.8	2.45	1.79
CD8	CM	0.21	0.67	2.65	1.79	0.33	0.72	0.91	0.67	1.99	2.22
Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	CM	7.03	2.28	18.9	3.73	49.6	55.6	20.1	12.6	22.1	12.7
CD8	CM	5.05	1.6	11.4	3.37	25.8	26.4	21.6	19.8	11.1	7.59

Tabel 49 - Figura 49: celule CD4+EM și Figura 23 celule CD8+EM

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	EM	90	n/d	98.3	98.9	83.9	97.2	84.1	99.8
CD8	EM	89.1	n/d	80.6	87.9	92.4	97.8	20.8	98.8
Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	EM	95.6	84.4	84.5	83.4	84.3	73.7	80.6	80.4
CD8	EM	97.2	87.9	90.8	82.3	82.5	72.2	74.5	73

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	EM	99.4	99.4	96.7	97.4	97.1	97.8	97.4	97.6	9.62	95.3
CD8	EM	98.3	98.6	91.8	95.5	98.8	98.9	98.8	99.2	93.9	95.2

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	EM	91.7	97	74.3	90.7	36.2	25.5	73.9	81.8	73.1	76.4
CD8	EM	91.5	96.1	83	90.8	73.2	71.9	77.1	78.2	84.1	85.1

Tabel 50 - Figura 51: celule CD4+CD28+ și celule Figura 25 CD8+CD28+

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	CD28+	4.6	5.85	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

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	CD28+	6.75	7.18	21.6	27.8	18.6	15	23	27.6
CD8	CD28+	24.6	17.9	10	6.4	28.6	18.9	15.7	11

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	CD28+	41.7	38.2	63.2	59.8	3.97	3.29	12.2	17.5	8.27	7.48
CD8	CD28+	13.4	8.52	14.5	12	53	54.4	56.5	62.1	76.5	80.8

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	CD28+	12.3	15.2	13.3	20	6.22	9.29	12.3	16.5	15.4	17.9
CD8	CD28+	6.9	2.43	2.07	3.75	24	34	27	36.9	42	43.9

Tabel 51 - Figura 53: celule CD4+PD-1+ și Figura 27 celule CD8+PD-1+

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063 M1064			
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate		
CD4	PD-1+	48.5	nd	nd	nd	77	40.6	nd	22.4
CD8	PD-1+	37.1	nd	nd	nd	56	24.6	nd	14

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	PD-1+	36.8	34.2	15.7	26.7	43.9	66	32.4	14.5
CD8	PD-1+	40.4	35.3	6.3	6.21	18	20.4	35.6	23.2

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	PD-1+	7.87	7.23	33.3	28.2	33.9	32.8	41.7	38	22.7	23.8
CD8	PD-1+	1.61	0.72	19.2	12.5	23.8	24.7	78.4	59.8	42.6	36.1

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	PD-1+	22.4	15.5	40.9	33.4	56	51.3	40.3	32.5	18.9	27.3
CD8	PD-1+	6.49	5.73	29.8	34.6	18.9	15.2	68.6	47	28.9	36.1

Tabel 52 - Figura 55: celule CD4+LAG3+ și Figura 29 celule CD8+LAG3+

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	LAG3+	16.8	nd	nd	nd	93.5	37.3	nd	6.8
CD8	LAG3+	74	nd	rid	nd	98.4	81.5	nd	31.8

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete decongelate	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	LAG3+	68.3	73.1	35.2	56.9	26.9	27.3	52.6	64
CD8	LAG3+	98.3	98.7	97.1	97.7	89.6	85.1	92.8	94.7

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	LAG3+	47.2	30.5	35.5	20.1	25	27.4	48.6	38	14.5	7.65
CD8	LAG3+	85.3	38.7	89.6	64.2	83.4	81.9	93.2	66.3	90.3	71.1

Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	LAG3+	65.8	68.2	40.9	46	44.1	39.1	52.1	51	48.5	17.7
CD8	LAG3+	95.4	97.8	92.4	92.5	97.5	98.4	98.2	98.3	97.7	78.1

Tabel 53 - Figura 57: celule CD4+TIM-3+ și Figura 31 celule CD8+TIM-3+

Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M 1063		M1064			
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate		
CD4	TIM3+	89.7	nd	nd	nd	98.3	87.6	nd	43.2		
CD8	TIM3+	99	nd	nd	nd	99.4	88.1	nd	47		
Celulă T	Markeri	M1061		M1062		M1063		M1064			
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate		
CD4	TIM3+	95.3	98	94.5	96.9	90.8	90.2	94.2	82.6		
CD8	TIM3+	98.9	98.9	97.3	96.7	97.1	97.7	98.2	95.7		
Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate	Proaspete	Decongelate
CD4	TIM3+	95	78.8	96.9	91.5	96.4	92.5	88.7	80.1	89.9	82.3
CD8	TIM3+	96.9	50.6	98.8	83	98.3	92.9	96.5	73.6	98.2	88.5
Celulă T	Markeri	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate	Re-REP proaspete	Re-REP decongelate
CD4	TIM3+	91.1	95.4	94.3	98.7	74	75.4	86.5	87.3	94.4	90.6
CD8	TIM3+	94.9	96.5	96.3	98.3	98	99	97.3	98.6	99	97.7

Tabel 54 - Figura 61: Determinarea qPCR și Flow-FISH a lungimii telomerilor

ID tumoare	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

ID tumoare	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
Flow-FISH	9.330236	1215041	8.782231	7.174627	8.961553	6112918	9.010615	7.944534	5.766692

EXEMPLUL 20: NOI LIMFOCITE INFILTRANTE ÎN TUMORI CRIOCONSERVATE (LN-144) ADMINISTRATE PACIENȚILOR CU MELANOM METASTATIC

Noile limfocite infiltrante în tumori crioconservate (LN-144) administrate pacienților cu melanom metastatic demonstrează eficiența și tolerabilitatea într-un studiu clinic faza 2 în mai multe centre.

5 INTRODUCERE:

Siguranța și eficiența terapiei celulare adoptive (ACT) cu limfocite infiltrante în tumori (TIL) necrioconservate a fost studiată la sute de pacienți cu melanom metastatic. Acest studiu clinic în centre multiple a fost inițiat TIL preparate central (LN-144) ca produși perfuzabili necrioconservați și crioconservați. Noul nostru proces de producție pentru LN-144 necrioconservate se utilizează în grupul 1 și un proces de LN-144 crioconservate scurtat de 3 săptămâni se utilizează în grupul 2. Prepararea din grupul 2 asigură un proces semnificativ mai scurt, împreună cu un produs TIL crioconservat care permite flexibilitate de programare a pacienților și de dozaj. Procesul de preparare mai scurt reduce timpul de așteptare pentru pacientul care primește produsul TIL și crioconservarea facilitează logistica și livrarea la destinațiile clinice.

15 METODE:

C-144-01 este un studiu prospectiv în centre multiple care evaluează pacienți cu melanom metastatic care primesc LN-144. În urma unei limfodepleții non-mieloablative cu regim de condiționare Cy/Flu, pacienții primesc o singură perfuzie de LN-144, urmată de administrarea IL-2 (600.000 IU/kg) până la 6 doze. Pacienții sunt evaluați cu privire la răspunsul obiectiv ca un obiectiv primar până la 24 de luni.

20 REZULTATE:

Caracterizăm LN-144 crioconservate administrate unui al doilea grup de pacienți, grupul 2 (N=10) în urma aceluiași regim de tratament perfuzabil pre- și post-TIL folosit pentru grupul 1.

Pacienții din grupul 2 au fost pretratați un număr mare de linii de tratament anterioare, toți pacienții urmând terapie anti-CTLA-4 și anti-PD-1 și încărcătură tumorală mai mare (SOD mediu: 15.3, 10.9 cm pentru grupurile 2, 1). Numărul mediu al terapiilor sistemice anterioare este 4, 3 pentru grupurile 2, respectiv 1. O analiză inițială a datelor de siguranță demonstrează tolerabilitatea comparabilă a LN-144 crioconservate. Profilul de siguranță pentru pacienții din grupul 1 care primesc LN-144 necrioconservate continuă să fie acceptabil pentru această populație de pacienți în stadiu târziu. TEAE cele mai frecvente observate în ambele grupuri sunt greața, anemia, neutropenia febrilă, număr scăzut de neutrofile, număr scăzut de trombocite. Analiza timpurie a datelor de eficiență indică activitate anti-tumorală, inclusiv PR, a terapiei TIL observate la pacienții tratați din grupul 2.

30 CONCLUZII:

Acesta reprezintă primul studiu clinic în centre multiple cu TIL preparate central care evaluează un proces nou pentru produsul autolog crioconservat cu un proces semnificativ mai scurt (aproximativ 3 săptămâni). Rezultatele preliminare indică LN-144 crioconservate ca o opțiune terapeutică sigură și tolerabilă pentru pacienți cu melanom metastatic care nu au prezentat succes în terapiile multiple anterioare, inclusiv inhibitori ai punctelor de control. LN-144 crioconservate asigură o mai mare flexibilitate pentru pacienți și personalul medical și permite un tratament mai imediat al pacienților care au încă această necesitate medicală mare. NCT02360579.

40 EXEMPLUL 21: EVALUAREA MEDIULUI FĂRĂ SER UTILIZAT ÎN PROCESUL 2A

Acest exemplu furnizează date care indică evaluarea eficienței mediului fără ser ca un înlocuitor pentru CM1, CM2 și CM4 standard care se utilizează în prezent în procesul 2A. Acest studiu a testat eficiența mediului fără ser (SFM) disponibil și a alternativelor fără ser ca înlocuitori în trei faze;

45 Faza 1: compararea eficienței expansiunii TIL (n = 3) folosind medii fără ser standard vs CTS Optimizer sau Prime T CDM sau Xvivo-20 cu sau fără înlocuitor de ser sau lizat trombocitar.

Faza 2: testarea mediilor fără ser candidat în procesul 2A la mini scară folosind G-Rex 5M (n=3).

50 INFORMAȚII DE BAZĂ

Deși combinația curentă de mediu folosită în cultura Pre și Post REP s-a dovedit eficientă, pot apărea eșecuri REP cu AIM-V. Dacă se identifică o alternativă fără ser eficientă, procesul ar fi mai simplu de efectuat în CMO, reducând numărul tipurilor de mediu folosite de la 3 la 1. În plus, SFM reduce probabilitatea de boală accidentală, eliminând utilizarea serului uman. Acest exemplu furnizează date care susțin utilizarea mediului fără ser procesele 2A.

55 ABREVIERI

μl	microlitru
CM1,2,4	Mediu complet 1,2,4
CTS Op	Timizer SFM Mediu fără ser Cell Therapy System OpTimizer
g	Grame

	Hr	Oră
	IFU	Instrucțiuni de utilizare
	IL-2	Citokina interleukina-2
	Min	Minut
5	MI	Mililitru
	°C	grade Celsius
	PreREP	Pre-Protocol de expansiune rapidă
	REP	Protocol de expansiune rapidă
	RT	Temperatura camerei
10	SR	Înlocuitor ser
	TIL	Limfocite infiltrante în tumori

MODEL EXPERIMENTAL

15 Pre-REP și REP au fost inițiate așa cum se menționează în LAB-008. Planul acestor 3 faze ale experimentului este indicat mai jos:

**Selectare
furnizor SFM**

- Comparare eficiență 3 SFM cu 3 tumori;
- CTS Optimizer (Life Tech) +/- SR or PL
- X-vivo 20 (Lonza) +/- SR or PL
- Prime T-CDM (Irvine) +/- SR or PL



**Testare în runde
2A la mini-scară**

- Testare candidat în G-REX 5Ms (scară 1:100)
- n=3

20 După cum se indică mai sus, proiectul a urmărit să testeze mediul fără ser și suplimentii în două etape.

25 Etapa 1. Selecția furnizorului de mediu fără ser. preREP și postREP au fost prevăzute să imite procesul 2A în placa G-Rex cu 24 de godeuri. PreREP s-au inițiat prin cultivarea fiecărui fragment/godeu al plăcii G-Rex cu 24 de godeuri în triplicat sau cvadruplicat per condiție. REP au fost inițiate în ziua 11 prin cultivarea a 4×10^5 TIL/godeu al plăcii G-Rex cu 24 de godeuri, separare în ziua 16, recoltare în ziua 22. S-au folosit CTS OpTimizer, X-Vivo 20 și Prime T-CDM ca posibile medii fără ser alternative pentru utilizare în PreREP și REP. S-a adăugat înlocuitor de ser CTS Immune SR (Life Technologies) sau lizat trombocitar (SDBB) la 3% în SFM. Fiecare condiție a fost planificată să se testeze cu cel puțin 3 tumori în preREP și postREP pentru a imita procesul 2A.

30 Etapa 2. Candidații identificați au fost testați în procese 2A la mini-scară per protocol (TP-17-007). Pe scurt, preREP s-au inițiat prin cultivarea a 2 fragmente/balon G-Rex 5M în triplicat per condiție. REP au fost inițiate în ziua 11 folosind 2×10^6 /balon G-Rex 5M, separare în ziua 16, recoltare în ziua 22.

Notă: unele tumori au fost procesate pentru măsurarea mai multor parametri într-un experiment.

OBSERVAȚII

35 Se observă rezultate echivalente sau statistic mai bune în creșterea celulară la compararea unui mediu fără ser cu standardul folosit în procesul 2A

Se observă fenotip, producție IFN- γ și analiză a metaboliților similare din TIL crescute în mediu fără ser în comparație cu TIL crescute în mediu standard folosit în procesul 2A.

REZULTATE

Testarea eficienței mediului fără ser cu privire la amplificarea TIL pre și post REP.

40 **CTS Optimizer + SR (Serum Replacement) au prezentat amplificare preREP mărită și amplificare TIL REP comparabilă.** CTS OpTimizer, X-Vivo 20 și Prime T-CDM s-au adăugat cu sau fără 3% CTS Immune CTS SR, s-au testat în condiții standard. În M1079 și L4026, CTS OpTimizer + CSR a prezentat expansiune TIL preREP mărită semnificativ ($p < 0.05$) comparativ cu condițiile standard (CM1, CM2, CM4) (Figura 62A). Invers, CTS Optimizer fără CSR nu a ajutat la expansiunea TIL preREP (Anexa -1,2,3). CTS Optimizer + CSR a prezentat expansiune TIL comparabilă în PostREP în două din cele 3 tumori testate (Figura-2B). A apărut o cantitate mare de variație în pre și post REP cu X-Vivo 20 și Prime T-CDM, în timp ce CTS Optimizer a fost relativ constant între probele în cvadruplicat. În plus, lizatul trombocitar cu SFM adăugat nu a mărit expansiunea TIL preREP și postREP comparativ cu standardul (Figura 62A). Aceste observații sugerează că înlocuirea serului este cu siguranță necesară pentru a asigura

50 o creștere comparabilă cu standardul nostru, CTS optimizer +CSR poate fi un candidat.

Testarea candidatului în G-Rex 5M la mini-scară (vezi Figura 64).

Analiza fenotipică a TIL post REP. Vezi Figura 66 și Tabelul 56 de mai jos.

Tabel 56: Predilecția CD8 cu CTS OpTimizer

	%CD8+ mediu	
	Standard	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

5 **Comparabilitatea interferon-gamma**

Interferon-gamma ELISA (Quantikine). Producerea IFN- γ s-a măsurat folosind kitul Quantikine ELISA de la R&D systems. CTS+SR a produs cantități comparabile de IFN- γ comparativ cu condiția noastră standard. Vezi Figura 67.

10 **EXEMPLUL 22: AMESTECUL FACTORILOR DE CREȘTERE T CELULARI IL-2/IL-15/IL-21 CREȘTE EXPANSIUNEA ȘI FUNCȚIA EFECTOARE A CELULELOR T INFILTRANTE ÎN TUMORI**

Terapia adoptivă cu celule T cu limfocite infiltrante în tumori (TIL) autologe a demonstrat eficiență clinică la pacienți cu melanom metastatic și carcinom de col uterin. În unele studii, rezultatele clinice mai bune s-au corelat pozitiv cu numărul total al celulelor introduse și/sau procentajul celulelor T CD8+. Majoritatea regimurilor de producție curente utilizează doar IL-2 pentru a favoriza creșterea TIL. Expansiunea mărită a limfocitelor a fost raportată folosind regimuri care conțin IL-15 și IL-21. Acest studiu descrie efectele pozitive ale adăugării IL-15 și IL-21 în protocolul IL-2-TIL din a doua generație recent implementat în mediul clinic.

20 **Materiale și metode**

Procesul de generare TIL include un pre-Protocol de expansiune rapidă (pre-REP), în care fragmente tumorale de 1-3 mm³ sunt introduse în mediu conținând IL-2. În timpul pre-REP, TIL ies din fragmentele tumorale și se amplifică în răspuns la stimulare cu IL-2.

Pentru a stimula și mai mult creșterea TIL, TIL sunt amplificate printr-o a doua perioadă de cultură denumită Protocol de expansiune rapidă (REP) care include PBMC feeder iradiate, IL-2 și anti-CD3. În acest studiu, s-a dezvoltat un protocol de expansiune pre-REP și REP scurtat pentru amplificarea TIL, menținând atributele fenotipice și funcționale ale produsului TIL final.

Acest protocol de producție TIL scurtat s-a folosit pentru a evalua impactul a IL-2 individual versus o combinație de IL2/IL-15/IL-21. Aceste două regimuri de cultură s-au comparat cu privire la producerea TIL crescute din tumori colorectale, melanom, de col uterin, mamare triplu negative, pulmonare și renale. La încheierea pre-REP, TIL cultivate au fost evaluate cu privire la expansiune, fenotip, funcție (CD107a+ și IEN γ) și repertoriul TCR V β .

Culturile pre-REP au fost inițiate folosind protocolul IL-2 (600 IU/ml) standard sau cu IL-15 (180 IU/ml) și IL-21 (IU/ml) pe lângă IL-2. Celulele au fost evaluate cu privire la expansiune la încheierea pre-REP. O cultură a fost clasificată ca având o creștere a expansiunii față de IL-2 dacă creșterea totală a fost mărită cu cel puțin 20%. Sunt prezentate aici studiile fenotipice și funcționale de melanom și pulmonare. Vezi tabelul 57 de mai jos.

Tabel 57: Creșterea expansiunii în timpul pre-REP cu IL-2/IL-15/IL-21 în indicații multiple

Histologie tumorală	# Studii IL-2 față de IL-2/IL-15/IL-21	# Studii care demonstrează >20% mărire a creșterii folosind IL-2/IL-15/IL-21 (față de IL-2)
Melanom	5	1/5(20%)

Histologie tumorală	# Studii IL-2 față de IL-2/IL-15/IL-21	# Studii care demonstrează >20% mărire a creșterii folosind IL-2/IL-15/IL-21 (față de IL-2)
Pulmonară	8	3/8 (38%)
Colorectală	11	7/11 (63%)
Col uterin	1	1/1 (100%)
Pancreatică	2	2/2 (100%)
Glioblastom	1	1/1 (100%)
Maamră triplu negativă	1	1/2 (50%)

Aceste date demonstrează o producție TIL mărită la cultivarea TIL cu IL-2/IL15/IL-21 față de IL-2 individual, pe lângă diferențele fenotipice și funcționale în plămân.

5 Efectul amestecului triplu asupra expansiunii TIL a fost specific afecțiunii, cu cel mai mare beneficiu pentru tumorile cu producție mică.

Raportul de celule T CD8+/CD4+ a fost mărit de tratament în produsul NSCLC TIL.

Activitatea celulelor T a părut să fie mărită adăugând IL-15 și IL-21 la IL-2, evaluată prin nivelurile de expresie CD107a în melanom și NSCLC.

10 Datele furnizate aici arată că expansiunea TIL folosind un proces mai fiabil și mai scurt, cum ar fi procesul 2A descris în prezenta cerere și alte exemple, poate fi adaptată pentru a include amestecul de citokine IL-2/IL-15/IL-21, reprezentând așadar un mijloc de favorizare a expansiunii TIL în afecțiuni specifice.

Experimentele în derulare evaluează de asemenea efectele IL-2/IL-15/IL-21 asupra funcției TIL.

Alte experimente vor evalua efectul amestecului triplu în timpul REP (prima expansiune).

15 Aceste observații sunt deosebit de relevante pentru optimizarea și standardizarea regimurilor de cultură TIL necesare pentru prepararea la scară mare a TIL cu aplicabilitate și disponibilitate largă necesară pentru o terapie anti-cancer principală.

EXEMPLUL 23: TIL CRIOCONSERVATE GENERATE CU O METODĂ SCURTATĂ

Bază

20 Acest exemplu furnizează date legate de un produs limfocitar infiltrant tumoral (TIL) crioconservat pentru LN-144, generat cu o metodă scurtată adecvată pentru prepararea comercială la capacitate mare prezintă atribute calitative favorabile pentru transferul celular adoptiv (ACT).

25 Metodele existente de generare a produșilor TIL clinici presupun intervenții ale operatorului, urmate de perioade extinse de incubare pentru a genera un produs terapeutic. procesul din generația 1 durează aproximativ 6 săptămâni, rezultând un produs proaspăt. Pentru a aduce terapia TIL la toți pacienții care pot beneficia de potențialul său, s-a dezvoltat o metodă de cultură scurtată de 22 de zile, generația 2, adecvată pentru preparare centralizată cu un produs medicamentos crioconservat, care poate fi transportat la distanță. Generația 2 reprezintă un proces de producție celulară flexibil, solid, închis și semi-automat, adaptabil la preparare la scară comercială. Produșii medicamentoși generați prin această metodă au atribute calitative comparabile cu cele generate din procesul din generația 1.

Obiectivele studiului:

35 Produșii medicamentoși generați prin procesele din generația 1 (o aplicare a procesului 1C) și generația 2 (o aplicare a procesului 2A) s-au evaluat pentru a determina comparabilitatea privind următoarele atribute calitative:

Doză și grad de expansiune.

Puritatea celulelor T și proporțiile de subseturi T celulare.

Expresia fenotipică a moleculelor co-stimulatoare pe subseturi T celulare.

40 Lungimea relativă medie a repetițiilor telomerice.

Capacitatea de a secreta citokine în răspuns la reactivare TCR.

Diversitatea receptorilor T celulari.

Prezentarea procesului terapeutic TIL:

45 EXTRAGERE: TIL ale pacientului se îndepărtează din micromediul tumoral supresor (prin rezecție chirurgicală a unei leziuni)

EXPANSIUNE: TIL s-au amplificat exponențial în cultură cu IL-2 pentru a produce $10^9 - 10^{11}$ TIL, înaintea introducerii în pacient

PREPARARE: pacientul primește NMA-LD (limfodepleție non-mieloablativă, ciclofosamidă: 60 mg/kg, IV x 2 doze și fludarabină: 25 mg/m² x 5 doze) pentru eliminarea micromediului tumoral posibil supresor și maximizarea grefării și potențialului terapiei TIL

PERFUZIE: pacientul primește TIL proprii amplificate (LN-144) și o durată scurtă de doză mare de IL-2 (600.000 IU/kg până la 6 doze) pentru a favoriza activarea, proliferarea și activitatea citotoxică anti-tumorală a TIL

10 **Tabel 58:** Rezumatul îmbunătățirilor procesului de preparare din generația 2

Etapă proces	Gen 1	Gen 2	Impact
Cultură fragmente	≤21 zile, bioreactoare multiple, intervenții multiple operator	≤11 zile, un singur bioreactor închis, fără intervenție	Scurtează cultura, reduce intervențiile, adaptare la automatizare.
Selecție TIL	TIL amplificate cu IL-2 crioconservate, testate, selecție pe baza fenotipului, decongelare, ≤ 30×10 ⁶ TIL în co-cultură	≤ 200×10 ⁶ TIL în masă direct în co-cultură	Scurtează procesul permițând însămânțare mărită a co-culturii, reduce etapele, elimină testarea
Expansiune rapidă	≤ 36 bioreactoare, 14 zile	≤ 5 bioreactoare, 11 zile	Reduce intervențiile de operator, sistem închis, scurtează procesul, adaptare la automatizare.
Recoltare/spălare	Reducere manuală a volumului și recoltare. Spălare manuală și concentrare prin centrifugare.	Reducere închisă semi-automată a volumului și recoltare. Spălare automată și concentrare.	Reduce intervențiile de operator, automat, menține sistemul închis.
Compoziție	Produs hipotermic proaspăt (2-8°C)	Produs crioconservat (≤ -150°C)	Flexibilitate transport, programare pacienți, testare cu eliberare mai rapidă, teste globale
Timp preparare	38 zile	22 zile	Revenire la pacient, cameră cu atmosferă controlată, COG

Metode de analiză și instrumente:

Doză și viabilitate: s-au prelevat probe din produsul final și s-au testat cu privire la celule nucleate totale, celule viabile totale și viabilitate, determinate prin contracolorare cu acridină portocalie / DAPI folosind aparatul automat NC-200.

Citometrie în flux: s-au prelevat probe din producții medicamentoși și s-au testat cu privire la identitate prin FACS. S-a determinat procentajul celulelor T ca populație CD45, CD3 dublu pozitivă de celule viabile. S-au decongelat probe satelit congelate sau fiole de control pentru fiecare proces și s-au testat cu privire la markeri fenotipici extinși inclusiv CD3, CD4, CD8, CD27 și CD28.

Lungimea relativă medie a repetițiilor telomerice: s-a folosit tehnologia Flow-FISH pentru a măsura lungimea medie a repetiției telomerice. Acest test s-a realizat așa cum se descrie în kitul DAKO® Telomere PNA/FITC pentru protocolul citometriei în flux. Pe scurt, 2×10⁶ celule TIL s-au combinat cu 2×10⁶ celule leucemice 1301. ADN a fost denaturat la 82°C 10 minute și sonda PNA-FITC s-a hibridizat în întuneric peste noapte la temperatura camerei. S-a folosit iodură de propidium pentru identificarea celulelor în faza G0/1.

Imunonalize: s-a măsurat capacitatea produsului medicamentos de a secreta citokine la reactivare în urma co-culturii cu sfere acoperite cu mAb (Life Technologies, anti-CD3, anti-CD28 & anti-CD137). După 24 h supernatanții de cultură au fost recoltați congelați, s-au decongelat și s-au testat prin ELISA folosind kitul Quantikine IFNγ ELISA (R&D systems) urmând instrucțiunile producătorului.

Diversitatea receptorilor T celulari: ARN din produsul final preparat a fost izolat și supus PCR multiplex cu primeri specifici pentru VDJ. Secvențele CDR3 exprimate în produsul TIL au fost amplificate

semi-cantitativ pentru a determina frecvența și prevalența clonelor TIL unice. Secvențierea s-a efectuat pe aparatul de masă Illumina MiSeq. Valorile sunt centralizate pentru a obține un punctaj reprezentativ pentru diversitatea relativă a receptorilor T celulari în produs.

Rezultate și concluzii:

- 5 Rezultatele sunt indicate în Figurile 75 - 81.
 Procesul din generația 2 produce un produs TIL cu atribute calitative comparabile cu generația 1.
 Generația 2 produce cantități similare de produși TIL foarte puri alcătuiți din proporții similare de subseturi T celulare care exprimă niveluri comparabile de molecule costimulatoare față de Gen 1.
 TIL din generația 2 TIL prezintă diversitate mărită a receptorilor TCR care inițiază secreție mare
 10 de citokine.
 Produsul medicamentos crioconservat introduce eficiențe logaritmice critice care permit flexibilitate a distribuției.
 Spre deosebire de procesele anterioare, platforma de expansiune scurtată de 22 de zile din generația 2 este o platformă fezabilă din punct de vedere logistic, cu capacitate de creștere a scării de producție, permițând generarea rapidă a dozelor la scară clinică pentru pacienți care necesită terapie urgent.
 15 Protocolul de producție TIL din generația 2 depășește multe dintre barierele care au împiedicat până acum aplicarea mai largă a terapiei TIL.

EXEMPLUL 24: EVALUAREA UNUI INTERVAL AL RAPORTURILOR DINTRE CELULELE FEEDER ALOGENICE:TIL DE LA 100:1 LA 25:

- 20 Acest studiu a testat proliferarea TIL la 25:1 și 50:1 față de control 100:1 celule feeder alogenice:TIL folosite în Procesul 1C.
 Studiile publicate de Surgery Branch at the National Cancer Institute au arătat că pragul pentru activarea optimă a TIL în balonul G-Rex 100 la 5×10^6 celule feeder alogenice per cm^2 la inițierea REP⁽¹⁾. Aceasta s-a confirmat prin modelare matematică și, cu același model, s-a estimat că folosind un strat feeder optimizat pentru contact celulă:celulă per suprafață unitară, proporția de celule feeder alogenice față de TIL
 25 poate fi scăzută la 25:1 cu efect minim asupra activării și expansiunii TIL.
 Acest studiu a stabilit o densitate optimă a celulelor feeder per suprafață unitară la inițierea REP și a validat intervalul eficient al raporturilor celulelor feeder alogenice la inițierea REP necesar pentru a scădea și normaliza cantitatea de celule feeder folosite per lot clinic. Studiul a validat de asemenea inițierea REP cu mai puțin de 200×10^6 TIL co-cultivate cu un număr fix de celule feeder.
 30 A. Volum celulă T (diametru 10 μm): $V = (4/3) \pi r^3 = 523.6 \mu\text{m}^3$
 B. Coloane G-Rex 100 (M) cu înălțime de 40 μm (4 celule): $V = (4/3) \pi r^3 = 4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3$
 C. Număr necesar de celule pentru umplerea coloanei B: $4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3 / 523.6 \mu\text{m}^3 = 7.6 \times 10^8 \mu\text{m}^3$
 * 0.64 = 4.86×10^8
 35 D. Număr de celule care pot fi activate optim în spațiu 4D: $4.86 \times 10^8 / 24 = 20.25 \times 10^6$
 E. Număr feeder și TIL extrapolat în G-Rex 500: TIL: 100×10^6 și Feeder: 2.5×10^9
 Ecuația 1. Aproximarea numărului de celule mononucleare necesar pentru a asigura o geometrie icosaedrală pentru activarea TIL într-un cilindru cu o bază de 100 cm^2 . Calculul produce rezultatul experimental de $\sim 5 \times 10^8$ pentru activarea prag a celulelor T care reflectă îndeaproape datele experimentale NCI.⁽¹⁾ (C) Înmulțitorul (0.64) este densitatea de umplere aleatorie pentru sferele echivalente calculată de Jaeger and Nagel in 1992 ⁽²⁾. (D) Împărțitorul 24 este numărul sferelor echivalente care ar putea intra în contact cu un obiect similar în spațiul 4-dimensional "numărul Newton."⁽³⁾

Referințe

- 45 ⁽¹⁾ Jin, Jianjian, et.al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr; 35(3): 283-292.
⁽²⁾ Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 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.

50 **EXEMPLUL 25: STUDII ALE ATRIBUTELOR CALITATIVE PRINCIPALE PENTRU TIL**

Bază

- Terapia adoptivă cu celule T cu limfocite infiltrante în tumori (TIL) autologe a demonstrat eficiența clinică la pacienți cu melanom metastatic și alte tumori¹⁻³.
 55 Majoritatea rapoartelor din studiile clinice au inclus analize de explorare a produșilor TIL perfuzați cu intenția de identificare a atributelor calitative cum ar fi sterilitate, identitate, puritate și potențial, care pot fi legate de eficiența și/sau siguranța produsului.^{4,5}
 Prezentăm aici evaluarea a trei parametri ai produsului TIL care pot contribui la o platformă viitoare de control al calității pentru utilizare în prepararea comercială a TIL.

Prezentarea procesului de terapie TIL

1. Tumoarea a fost excizată de la pacient și transportată la unitatea de producție GMP.
 2. La sosire, tumoarea este fragmentată și așezată în baloane cu IL-2 pentru un pre-Protocol de expansiune rapidă (REP).
 3. TIL pre-REP au fost amplificate în protocol REP în prezența PBMC iradiate, a anticorpului anti-CD3 (30 ng/mL) și IL-2 (3000 IU/mL).
 4. TIL s-au evaluat cu privire la atributele calitative critice inclusiv: (1) identitate, (2) puritate și (3) potențial.
 5. Înainte de perfuzia TIL amplificate (LN-144), pacientul a primit un regim de limfodepleție non-mieloablativ constând din ciclofosamidă și fludarabină. În urma perfuziei TIL, pacienții au primit o durată scurtă (până la 6 doze) de IL-2 în doză mare (600.000 IU/kg) pentru a susține creșterea și grefarea TIL de transfer.

Obiectivele studiului

Obiectiv: caracterizarea completă a TIL cu privire la identitate, puritate și potency și așadar (a) ghidarea definirii atributelor calitative critice și (b) susținerea stabilirii criteriilor de eliberare implementate în producția comercială a TIL.

Strategie: dezvoltarea următoarelor metodologii analitice pentru a susține caracterizarea TIL. În mod specific, s-au efectuat următoarele metode: analiza fenotipică prin citometrie în flux pentru evaluarea de identitate și puritate, testul de detecție a celulelor tumorale reziduale pentru măsurarea purității și testul de eliberare interferon-gamma pentru evaluarea potențialului.

Materiale și metode**Identitate și puritate**

Caracterizarea fenotipică: produșii TIL au fost colorați cu anticorpi anti-CD45, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4, anti-CD45RA, anti CCR7, anti CD62L, anti-CD19, anti-CD16 și anti-CD56 și analizați prin citometrie în flux pentru cuantificarea subseturilor de celule T și non-T.

Puritate

Test de detecție a celulelor tumorale reziduale: produșii TIL au fost colorați cu anticorpi anti-MCSP (condroitin sulfat proteoglican asociat cu melanom) și anti-CD45, precum și cu colorant Live/Dead fixable Aqua, după care s-au analizat prin citometrie în flux pentru detectarea celulelor de melanom. S-a folosit un control pentru evaluarea preciziei detecției tumorale și pentru stabilirea criteriilor pentru analiza datelor.

Potențial

Test de eliberare IFN γ : produșii TIL au fost re-stimulați cu sfere acoperite cu anti-CD3/CD28/CD137 18 - 24 ore, după care s-au recoltat supernatanții pentru evaluarea secreției IFN γ folosind un test ELISA.

Rezultate

Identitate: majoritatea (>99%) produsului TIL din melanom a constat din celule CD45⁺CD3⁺.

Figurile 86A-86C prezintă caracterizarea fenotipică a produșilor TIL folosind un test de citometrie în flux în 10 culori. (A) Procentajul subseturilor de celule T și non-T a fost definit de CD45⁺CD3⁺ și CD45⁻(non-limfocit)/CD45⁺CD3⁻ (non-T-limfocit). În total, >99% dintre produșii TIL au constat din celule T (CD45⁺CD3⁺). Se indică o medie a produșilor TIL (n=10). (B) Procentajul a două subseturi de celule T inclusiv CD45⁺CD3⁺CD8⁺ (cerc gol albastru) și CD45⁺CD3⁺CD4⁺ (cerc gol roz). Nu s-a observat nici o diferență statistică în procentajul celor două subseturi folosind testul t student neîmperecheat (P=0.68). (C) Populația de celule non-T a fost caracterizată pentru patru subseturi diferite inclusiv: 1) non-limfocit (CD45⁻), 2) celule NK (CD45⁺CD3⁻CD16⁺/56⁺), 3) celule B (CD45⁺CD19⁺) și 4) non-NK/B (CD45⁺CD3⁻CD16⁻CD56⁻CD19⁻).

Identitate: majoritatea produsului TIL din melanom a prezentat fenotip de celule T efectoare sau de memorie, asociat cu funcția citotoxică a celulelor T.

Figura 87A și 87B prezintă caracterizarea subseturilor de celule T în populații CD45⁺CD3⁺CD4⁺ și CD45⁺CD3⁺CD8⁺. Subseturile de celule T naive, de memorie centrală (TCM), memorie efectoare (TEF) și memorie efectoare RA⁺(EMRA) s-au definit folosind CD45RA și CCR7. Figurile 87A și 87B indică subseturi de celule T reprezentative de la 10 produși TIL finali în populații CD4⁺ (A) și CD8⁺ (B). Subsetul T de memorie efectoare (cerc gol albastru) a reprezentat o populație majoră (>93%) în ambele subseturi CD4⁺ și CD8⁺ ale produsului final TIL. Mai puțin de 7% dintre produșii TIL au fost subset de memorie centrală (cerc gol roz). Subseturile EMRA (cerc gol gri) și naive (cerc gol negru) au fost abia detectate în produsul TIL (<0.02%). Valorile p reprezintă diferența între EM și CM cu test t student neîmperecheat.

Puritate: MCSP reprezintă un marker tumoral de melanom pentru testul de puritate.

Figurile 88A și 88B indică detecția expresiei MCSP și EpCAM în celule tumorale de melanom. Liniile celulare tumorale de melanom (WM35, 526 și 888), liniile celulare de melanom obținute de la pacienți au fost generate conform metodelor descrise în prezenta (1028, 1032 și 1041) și o linie celulară de adenom colorectal (HT29 ca un control negativ) s-au caracterizat prin colorare pentru markeri MCSP (condroitin sulfat proteoglican asociat cu melanom) și EpCAM (molecula de adeziune celulară epitelială). (A) În medie 90% dintre celulele tumorale de melanom au exprimat MCSP. (B) Expresia EpCAM nu a fost detectată în liniile celulare tumorale de melanom comparativ cu control pozitiv HT29, o linie celulară tumorală EpCAM+.

Puritate: dezvoltarea unui test de citometrie în flux pentru detectarea celulelor tumorale reziduale în produșii TIL.

Figurile 89A și 89B ilustrează detecția controlului pentru determinarea preciziei detecției tumorii. Testul s-a efectuat prin adăugarea unor cantități cunoscute de celule tumorale în suspensii PBMC (n=10). Celulele tumorale de melanom MCSP+526 s-au diluat la raporturi de 1:10, 1:100 și 1:1.000, apoi s-au amestecat cu PBMC și s-au colorat cu anticorpi anti-MCSP și anti-CD45 și colorant pentru celule vii/moarte și s-au analizat prin citometrie în flux. (A) Aproximativ 3000, 300 și 30 celule s-au detectat în diluția de 1:10, 1:100, respectiv 1:1000. (B) S-a folosit o medie (AV) și o abatere standard (SD) de celule din fiecare condiție pentru a defini limitele de referință superioare și inferioare.

Puritate: calificarea testului de detecție a tumorii reziduale folosind un control.

Figurile 90A și 90B indică studiul de repetabilitate a limitelor superioare și inferioare în control. S-au efectuat trei experimente independente în triplicat pentru a determina repetabilitatea testului. (A) Numărul celulelor tumorale MCSP+ detectate s-a încadrat în intervalul limitelor de referință superioare și inferioare. (B) Graficul de regresie liniară demonstrează corelarea între celulele MCSP+ și diluările de adăugare ($R^2=0.99$), linia neagră indicând cea mai bună ajustare. Liniile verde și gri întrerupte reprezintă limitele de predicție de 95% în curba standard și probe (Exp#1 - 3).

Puritate: contaminanții celulari de melanom au fost sub limitele de detecție în produsul TIL final.

Figurile 91A și 91B indică detecția tumorii de melanom reziduale în produșii TIL. Produșii TIL au fost evaluați cu privire la contaminarea tumorală reziduală folosind testul dezvoltat (n=15). Numărul și procentajul mediu al evenimentelor MCSP+ detectabile a fost 2, respectiv 0.0002%.

Potențial: secreția IFN γ de către TIL (constant > 1000 pg/ml) a demonstrat funcția efectoră a produsului TIL.

Figura 92 reprezintă evaluarea de potențial al produșilor TIL în urma activării celulelor T. Secreția IFN γ după re-stimulare cu anti-CD3/CD28/CD137 în produșii TIL evaluați prin ELISA în duplicat (n=5). Secreția IFN γ de către produșii TIL a fost semnificativ mai mare față de controlul nestimulat folosind testul Wilcoxon (P=0.02) și constant >1000 pg/ml. Secreția IFN γ >200 pg/ml a fost considerată potentă. Valoarea p <0.05 este considerată semnificativă statistic.

Concluzie

S-au evaluat parametrii principali de identitate, puritate și potențial ai produșilor TIL. Produșii TIL preparați conform metodelor descrise în prezenta au constat din peste 99% celule T CD45+CD3+. Majoritatea subseturilor TIL CD4+ și CD8+ au prezentat un fenotip de memorie efectoră, asociat cu funcția citotoxică a celulelor T. A fost dezvoltat cu succes un test pe bază de citometrie în flux pentru detectarea celulelor tumorale de melanom contaminante în produsul TIL final. Aplicând acest test, celulele tumorale de melanom contaminante în produsul TIL final au fost sub limitele de detecție. Secreția IFN γ de către produsul TIL final în urma restimulării anti-CD3/CD28/CD137 poate avea rol de test de potențial pentru TIL preparate comercial. Aceste date stau la baza unei platforme de control al calității care va susține dezvoltarea atributelor calitative critice pentru producerea comercială a produșilor TIL.

EXEMPLUL 26: UN PRODUS TIL CRIOCONSERVAT GENERAT CU O METODĂ SCURTATĂ ADECVATĂ PENTRU PRODUCȚIE COMERCIALĂ LA SCARĂ MARE PREZINTĂ ATRIBUTE CALITATIVE FAVORABILE PENTRU TRANSFER CELULAR ADOPTIV

Bază

Metodele clasice de generare a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) pentru transfer celular adoptiv (ACT) presupun etape multiple de incubare *ex vivo* pentru a obține un produs proaspăt (necrioconservat).

Procesul din prima generație (Gen 1) a produs o doză de TIL proaspete în aproximativ 6 săptămâni. S-a dezvoltat un proces de producție TIL din a doua generație (Gen 2), care scurtează durata culturii *ex vivo* la 22 de zile (Figura 93).

Procesul Gen 2 este adecvat pentru producție centralizată și generează un produs TIL crioconservat care îmbunătățește programarea, logistica și livrarea la unitățile clinice. Produsul TIL crioconservat pentru LN-144 obținut din procesul Gen 2 are atribute calitative comparabile cu produsul TIL necrioconservat din

metoda Gen 1. Metoda de preparare TIL Gen 2 reprezintă un proces flexibil, solid, închis și semi-automat, adaptabil la producție TIL la scară comercială.

Obiectivul studiului

5 Producții perfuzabili TIL generați prin procesele Gen 1 și Gen 2 s-au evaluat pentru a determina comparabilitatea următoarelor atribute calitative: (1) număr celule (doză), viabilitate, rata de creștere în faza REP, (2) puritatea celulelor T și expresia fenotipică a moleculelor co-stimulatoare pe subseturi de celule T, (3) lungimea relativă medie a repetițiilor telomerice, (4) capacitatea de a secreta IFN γ în răspuns la activare CD3, CD28, CD137 și (5) diversitatea receptorilor T celulari prezenți în produsul final (Figura 94).

10 Metode de analiză și instrumente

Număr de celule și viabilitate: producții preparați finali au fost eșantionați și analizați cu privire la celule nucleate totale, celule viabile totale și viabilitate determinate prin contracolorare cu acridină portocalie/DAPI folosind aparatul NC-200. Loturile de dezvoltare a procesul s-au analizat pe Nexcellom Cellometer K2 folosind colorare fluorescență duală cu acridină portocalie/iodură de propidium.

15 Markeri fenotipici: producții preparați au fost eșantionați și analizați cu privire la identitate prin colorare imunofluorescentă. Celulele T procentuale s-au determinat ca populație CD45+,CD3+ (dublu pozitivă) de celule viabile. Fiolele satelit congelate pentru fiecare proces au fost decongelate și testate cu privire la markerii fenotipici extinși inclusiv CD3, CD4, CD8, CD27 și CD28. Producții proaspeți s-au obținut pe BD FACS Canto II și markerii fenotipici extinși pe producții decongelate s-au obținut pe Bio-Rad ZE5 Cell Analyzer.

20 Lungimea relativă medie a repetițiilor telomerice: s-a folosit tehnologia Flow-FISH pentru a măsura lungimea medie a repetiției telomerice. Acest test s-a realizat așa cum se descrie în kitul DAKO® Telomere PNA/FITC pentru protocolul de citometrie în flux. Pe scurt, 2.0×10^6 celule TIL s-au combinat cu 2.0×10^6 celule T leucemice din linia celulară umană (1301). ADN a fost denaturată la 82°C 10 minute și sonda PNA-FITC s-a încrucișat în întuneric peste noapte la temperatura camerei. S-a folosit iodură de propidium pentru identificarea celulelor în faza G0/1.

25 Funcția imună: s-a măsurat capacitatea produsului perfuzabil de a secreta IFN γ la reactivare în urma co-culturii cu sfere acoperite cu anticorp (Life Technologies, anti-CD3, anti-CD28 & anti-CD137). După 24 ore supernatanții de cultură au fost recoltați, congelați, decongelate și analizați prin ELISA folosind kitul Quantikine IFN γ ELISA (R&D systems) urmând instrucțiunile producătorului.

30 Diversitatea receptorilor T celulari: ARN din producții s-a izolat și a fost supus PCR multiplex cu primeri specifici VDJ. Secvențele CDR3 exprimate în produsul TIL au fost amplificate semi-cantitativ și secvențiate pentru a determina frecvența și prevalența clonelor TIL unice. Secvențierea s-a efectuat pe aparat de masă Illumina MiSeq. Valorile au fost centralizate pentru a obține un punctaj reprezentativ pentru diversitatea relativă a receptorilor T celulari în produs.

35 Rezultate

În ziua 22 produsul celular redus în volum a fost colectat și eșantionat pentru a determina performanța culturii înainte de spălare și preparare. Figurile 95A-95C indică celulele viabile totale, rata de creștere și viabilitate. (A) Probele au fost analizate pe sistemul de numărare automat NC-200 așa cum s-a descris anterior. Densitatea totală a celulelor viabile este determinată de media numărărilor în duplicat din 4 probe independente. Procesul Gen 2 a generat un produs TIL cu doză similară cu Gen 1 (medie Gen 1 = $4.10 \times 10^{10} \pm 2.8 \times 10^{10}$, medie Gen 2 = $4.12 \times 10^{10} \pm 2.5 \times 10^{10}$). (B) Rata de creștere s-a calculat pentru faza REP ca. (C) Viabilitatea celulelor s-a evaluat din 9 loturi de dezvoltare a procesului folosind Cellometer K2 așa cum s-a descris anterior. Nu s-a observat scădere semnificativă în viabilitatea celulelor în urma unui singur ciclu de îngheț-dezghet al produsului preparat. Scăderea medie a viabilității la decongelare și eșantionare a fost 2.19%.

45 Figurile 96A-96C arată că producții Gen 2 sunt culturi de celule T foarte pure care exprimă molecule costimulatoare la niveluri comparabile cu Gen 1. (Figura 96A) Producții medicamentoși preparați proaspeți s-au analizat cu privire la identitate prin citometrie în flux pentru eliberare. Procesele Gen 1 și Gen 2 produc culturi de celule T de puritate mare definite de fenotip (dublu pozitiv) CD45+,CD3+. (Figurile 96B și 96C) Fiolele satelit crioconservate de produs medicamentos preparat s-au decongelat și s-au analizat cu privire la fenotipul extins prin citometrie în flux așa cum s-a descris anterior. Producții Gen 1 și Gen 2 au exprimat niveluri similare de molecule costimulatoare CD27 și CD28 pe subseturi de celule T. Moleculele costimulatoare cum ar fi CD27 și CD28 pot fi necesare pentru a furniza semnalizare secundară și terțiară necesară pentru proliferarea celulelor efectoare la activarea receptorului T celular. Valoarea p s-a calculat folosind testul 't' Mann-Whitney.

50 Figura 97 arată că producții Gen 2 tind către telomer relativ mai lung. Lungimi. S-a folosit tehnologia Flow-FISH pentru a măsura lungimea medie a repetiției telomerice așa cum s-a descris anterior. Valoarea RTL a arătat că fluorescența telomerică medie per cromozom/genom în Gen 1 a fost $7.5 \% \pm 2.1 \%$

și Gen 2 a fost $8.4\% \pm 1.8\%$ din fluorescența telomerică per cromozom/genom în liniile celulare de control (linia celulară leucemică 1301). Datele arată că produșii Gen 2 în medie au lungime a telomerilor comparabilă cu produșii Gen 1. Lungimea telomerilor este o măsurare surogat a duratei culturii celulare *ex vivo*.

5 Figura 98 arată că produșii medicamentoși Gen 2 secretă IFN γ în răspuns la activare CD3, CD28 și CD137. Produșii medicamentoși crioconservați s-au decongelat și s-au incubat cu sfere acoperite cu anticorp așa cum s-a descris anterior. Datele sunt exprimate ca o cantitate de IFN γ produsă de 5×10^5 celule viabile în 24h. Produșii medicamentoși Gen 2 au prezentat o capacitate crescută de a produce IFN γ la reactivare față de produșii medicamentoși Gen 1. Capacitatea produsului medicamentos de a fi reactivat și
10 de a secreta citokine este o măsură surogat a funcției in-vivo la legarea TCR de antigenul asociat în contextul HLA.

Figurile 99A și 99B arată că produșii medicamentoși Gen 2 au o diversitate mărită a receptorilor T celulari unici. Diversitatea receptorilor T celulari a fost evaluată după cum urmează. ARN din 10×10^6 TIL din Gen 1 și Gen 2 s-a analizat pentru a determina numărul total și frecvența secvențelor CDR3 unice
15 prezente în fiecare produs. (Figura 99A) Secvențele CDR3 unice au fost reprezentate față de frecvență în fiecare produs pentru a produce un punctaj reprezentativ al diversității totale a receptorilor T celulari în produs. Produșii TIL din ambele procese au fost alcătuiți din populații policlonale de celule T cu diferite specificități și avidități antigenice. Gama repertoriului celular T total poate indica numărul epitopilor care pot acționa pe celule tumorale.

20 Concluzii

Procesul de producție Gen 2 a generat un produs TIL (LN-144) cu atribute calitative comparabile cu Gen 1. Gen 2 a produs doze similare de TIL foarte pure. Subseturile de celule T au fost în proporții similare și au exprimat moleculele costimulatoare la niveluri comparabile față de Gen 1. TIL din Gen 2 au
25 avut o tendință către lungime relativă mai mare a telomerilor porporțională cu perioada de cultură *ex vivo* redusă. TIL din Gen 2 au prezentat o diversitate crescută a receptorilor TCR care, la activare, au inițiat secreție mare a IFN- γ , o măsură a funcției efectoare citolitice. Astfel, procesul de expansiune scurtat de 22 de zile Gen 2 cu produs crioconservat prezintă o platformă de producție TIL logistic fezabilă și adaptabilă la scară care permite generarea rapidă a dozelor la scară clinică pentru pacienți cu cancer care necesită imediat o opțiune de terapie nouă.

30 Referințe

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).

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 papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *J Clin Oncol* 33, doi:10.1200/jco.2014.58.9093 (2015).

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.

45 **EXEMPLUL 27: AMESTECUL DE FACTORI DE CREȘTERE T CELULARI IL-2/IL-15/IL-21 A CRESCUT EXPANSIUNEA ȘI FUNCȚIA EFECTOARE A CELULELOR T INFILTRANTE ÎN TUMORI ÎNTR-UN PROCES NOU DESCRIS ÎN PREZENTA**

Bază

Terapia adoptivă cu celule T cu TIL autologe a demonstrat eficiența clinică la pacienți cu melanom metastatic și carcinom de col uterin. În unele studii, rezultatele clinice mai bune s-au corelat pozitiv cu
50 numărul total al celulelor perfuzate și/sau procentajul celulelor T CD8+. Majoritatea regmurilor actuale de producție utilizează doar IL-2 pentru a favoriza creșterea TIL. A fost raportată expansiune limfocitară cronică folosind regimuri cu IL-15 și IL-21. Acest studiu descrie efectele pozitive și sinergiile adăugării IL-15 și IL-21 în aplicări ale procesului 2A și procesului de producție TIL din generația 2.

Generarea TIL folosind un proces nou descris în prezenta

55 Tumoarea este excizată de la pacient și transportată la unitatea de producție GMP sau la un laborator în scop de cercetare. La sosire, tumoarea a fost fragmentată și așezată în baloane cu IL-2 pentru pre-Protocolul de expansiune rapidă (REP) 11 zile. Pentru studiile cu amestec triplu, IL-2, IL-15 și IL-21 (IL-2/IL-15/IL-21) s-au adăugat la inițierea pre-REP. Pentru Protocolul de expansiune rapidă (REP), TIL au fost cultivate cu feeder și anticorp anti-CD3 alte 11 zile (Figura 100).

Materiale și metode

Procesul de generare TIL a inclus un pre-Protocol de expansiune rapidă (pre-REP), în care fragmentele tumorale cu dimensiune de 1-3 mm³ s-au așezat în mediu conținând IL-2. În timpul pre-REP, TIL au ieșit din fragmentele tumorale și se amplifică în răspuns la stimulare IL-2.

5 Pentru a stimula și mai mult creșterea TIL, TIL au fost amplificate printr-o a doua perioadă de cultură denumită Protocol de expansiune rapidă (REP) care a inclus PBMC feeder iradiate, IL-2 și anticorp anti-CD3. Un protocol de expansiune scurtat pre-REP și REP s-a dezvoltat pentru amplificarea TIL cu menținerea atributelor fenotipice și funcționale ale produsului TIL final. Acest protocol de generare TIL scurtat s-a folosit pentru a evalua impactul IL-2 individual versus o combinație de IL-2/IL-15/IL-21 adăugată
10 în etapa pre-REP. Aceste două regimuri de cultură s-au comparat pentru generarea TIL crescute din tumori colorectale, melanom, de col uterin, mamare triplu negative, pulmonare și renale. La încheierea pre-REP, TIL cultivate s-au evaluat cu privire la expansiune, fenotip, funcție (CD107a+ și IPN γ) și repertoriul TCR V β .

15 Studiul indică creșterea expansiunii în timpul pre-REP cu IL-2/IL-15/IL-21 în histologii tumorale multiple. Culturile Pre-REP au fost inițiate folosind protocolul IL-2 standard (6000 IU/mL) sau cu IL-15 (180 IU/mL) și IL-21 (1 IU/mL) pe lângă IL-2 (Figura 101). Celulele s-au evaluat cu privire la expansiune la încheierea pre-REP. O cultură a fost clasificată ca având expansiune mărită față de IL-2 dacă creșterea totală a fost mărită cu cel puțin 20%. Studiile fenotipice și funcționale cu elanom și tumoare pulmonară se discută mai detaliat în paragrafele următoare (text îngroșat în Figura 101).

20 IL-2/IL-15/IL-21 a crescut procentajul de celule CD8+ în carcinom pulmonar, dar nu în melanom. În Figurile 102A și 102B, TIL din (A) melanom (n=4) și (B) plămân (n=7) s-au evaluat fenotipic cu privire la celulele CD4+ și CD8+ folosind citometrie în flux post pre-REP. Valoarea p reprezintă diferență dintre condițiile IL-2 și IL-12/IL-15/IL-21 folosind testul t student neîmperecheat.

25 Expresia CD27 a fost ușor mărită în celulele CD8+ din culturi tratate cu IL-2/IL-15/IL-21. În Figurile 103A și 103B, TIL din (A) melanom (n=4) și (B) plămân (n=7) s-au evaluat fenotipic cu privire la CD27+ și CD28+ în celulele CD4+ și CD8+ folosind citometrie în flux post pre-REP. Expresia CD27, un marker celular asociat cu un fenotip mai tânăr care s-a corelat cu rezultatele terapiei T celulare adoptive, a fost ușor mărită în TIL CD8+ derivate din cultură cu IL-2/IL-15/IL-21 vs IL-2 individual.

30 Subseturile de celule T au fost nemodificate cu adăugarea IL-15/IL-21. În Figurile 104A și 104B, TIL s-au evaluat fenotipic cu privire la subseturile de celule efectoare/memorie (CD45RA și CCR7) în celulele CD8+ și CD4+ (date nereprezentate) din (A) melanom (n=4) și (B) plămân (n=8) prin citometrie în flux post pre-REP. TEM=memorie efectoare (CD45RA-, CCR7-), TCM=memorie centrală (CD45RA+, CCR7+), TSCM=memorie celule stem (CD45RA+, CCR7+), TEMRA=celule T efectoare (CD45RA+ CCR7-).

35 Capacitatea funcțională a TIL a fost mărită diferențiat cu IL-2/IL-15/IL-21. În Figurile 105A și 105B, TIL din (A) melanom (n=4) și (B) plămân (n=5) s-au evaluat cu privire la expresia CD107a+ în răspuns la stimulare PMA 4 ore în celulele CD4+ și CD8+ prin citometrie în flux. (C) TIL pre-REP derivate din melanom și plămân au fost stimulate 24 ore cu anticorp anti-CD3 solubil și supernatantii s-au evaluat cu privire la IFN γ prin ELISA.

40 Frecvența relativă a repertoriului TCRv β a fost modificată în răspuns la IL-2/IL-15/IL-21 în plămân, dar nu în melanom. În Figurile 106A și 106B, repertoriul TCRv β (24 specificități) s-a evaluat în TIL dintr-un (A) melanom și (B) o tumoare pulmonară folosind kitul Beckman Coulter pentru citometrie în flux.

Rezumat

45 Această analiză demonstrează capacitatea amestecului IL-2/IL-15/IL-21 de a crește numărul TIL comparativ cu IL-2 individual (>20%) în procesul de generare 2, pe lângă impactul asupra caracteristicilor fenotipice și funcționale.

50 Efectul amestecului triplu asupra expansiunii TIL a fost dependent de histologie. Raportul celulelor T CD8+/CD4+ a fost mărit la adăugarea IL-2/IL-15/IL-21 în tumori pulmonare. Adăugarea IL-15 și IL-21 a mărit expresia CD107a și producția IFN γ în TIL derivate din tumori pulmonare. Adăugarea IL-2/IL-15/IL-21 a modificat repertoriul TCRv β în plămân. Procesul de expansiune TIL din generația 2 s-a folosit pentru a include amestecul de citokine IL-2/IL-15/IL-21, reprezentând așadar un mijloc de a favoriza și mai mult expansiunea TIL în histologii tumorale specifice, cum ar fi tumori pulmonare și colorectale. Aceste observații sunt deosebit de relevante pentru optimizarea și standardizarea regimurilor de cultură TIL
55 necesare pentru producția la scară mare a TIL cu aplicabilitatea și disponibilitatea largă necesară a unei terapii anti-cancer principale.

EXEMPLUL 28: NOILE LIMFOCITE INFILTRANTE ÎN TUMORI (LN-144) CRIOCONSERVATE ADMINISTRATE PACIENȚILOR CU MELANOM METASTATIC AU

DEMONSTRAT EFICIENȚĂ ȘI TOLERABILITATE ÎNTR-UN STUDIU CLINIC FAZA 2 ÎN CENTRE MULTIPLE**Bază**

5 Siguranța și eficiența terapiei celulare adoptive (ACT) utilizând limfocite infiltrante în tumori (TIL) au fost studiate la sute de pacienți cu melanom metastatic și au demonstrat rate de răspuns obiectiv semnificative și durabile (ORR).¹ Într-un studiu în faza 2 în desfășurare, C-144-01 care utilizează producție GMP centralizată a TIL, s-au evaluat procesele de generare TIL necrioconservate generația 1 (Gen 1) și TIL crioconservate generația 2 (Gen 2).

10 Gen 1 are o durată de aproximativ 5-6 săptămâni (administrare în grupul 1 din studiul C-144-01), iar Gen 2 are o durată de 22 de zile (procesul 2A, administrare în grupul 2 din studiul C-144-01). Datele de la pacienții din grupul 1 care au primit produsul Gen 1 LN-144 au fost încurajatoare pentru tratarea pacienților cu melanom metastatic post-PD-1, terapia TIL producând răspunsuri.² Beneficiile Gen 2 au inclus: (A) reducerea timpului de așteptare al pacienților și medicilor pentru administrarea TIL la pacient; (B) crioconservarea permite flexibilitatea programării, distribuției și livrării; și (C) reducerea costurilor de producție. Sunt prezentate aici datele preliminare din grupul 2. Figura 107 reprezintă o aplicare a procesului de producție LN-144 crioconservate Gen 2 (procesul 2A).

Planul studiului: C-144-01 faza 2 în melanom metastatic

20 Studiu faza 2, în centre multiple, cu 3 grupuri pentru evaluarea eficienței și siguranței limfocitelor infiltrante în tumori (LN-144) autologe pentru tratarea pacienților cu melanom metastatic.

Criterii de includere: (1) melanom metastatic măsurabil și ≥ 1 leziune rezecabilă pentru generarea TIL; (2) avansare cu cel puțin o linie anterioară de terapie sistemică; (3) vârsta ≥ 18 ; și (4) ECOG PS 0-1.

Grupuri de tratament: (1) produs LN-144 necrioconservat; (2) produs LN-144 crioconservat; și (3) retratament cu LN-144 pentru pacienți fără răspuns sau cu avansare după răspuns inițial. Figura 108 indică planul studiului.

25 Obiective: (1) primar: eficiența definită ca ORR și (2) secundar: siguranța și eficiența.

Metode

Set de siguranță grupul 2: 13 pacienți care au suferit rezecție în scopul generării TIL și au primit orice componentă a tratamentului studiat.

30 Set de eficiență grupul 2: 9 pacienți care au primit precondiționare NMA-LD, perfuzie LN-144 și cel puțin o doză de IL-2 și au avut cel puțin o evaluare a eficienței. 4 pacienți nu au avut evaluare de eficiență la momentul împărțirii subseturilor de date.

S-au indicat datele de biomarkeri pentru toate datele disponibile în subseturile de date.

Rezultate

35 Figura 109 reprezintă un tabel care ilustrează compararea caracteristicilor pacienților din grupul 1 (ASCO 2017) vs grupul 2. Grupul 2: 4 terapii anterioare medii; toți pacienții au primit anti-PD-1 și anti-CTLA-4 anterior; și au avut încărcătură tumorală mai mare reflectată de suma mai mare a diametrelor (SOD) pentru leziuni țintă și medie LDH mai mare la referință. Figura 110 prezintă un tabel indicând evenimentele adverse asociate cu tratamentul ($\geq 30\%$).

40 Pentru grupul 2 (LN-144 crioconservat), caracteristicile produsului și terapiei TIL au fost (1) număr mediu de celule TIL administrate: 37×10^9 și (2) număr mediu de administrări de doze IL-2 a fost 4.5. Figura 111 reprezintă eficiența produsului și terapiei TIL pentru pacienții #1 - #8.

45 Figura 112 reprezintă starea clinică a răspunsului pacienților evaluabili cu boală stabilă (SD) sau un răspuns mai bun. Un răspuns parțial (PR) pentru pacientul 6 a fost neconfirmat, fiindcă pacientul nu a ajuns încă la a doua evaluare de eficiență. Un pacient (pacientul 9) a decedat înainte de prima evaluarea (este considerat încă în setul de eficiență).

50 Din cei 9 pacienți din serul de eficiență, un pacient (pacientul 9) nu a fost evaluabil (NE) din cauza decesului legat de melanom înainte de prima evaluarea tumorală nereprezentată în Figura 112. S-au observat răspunsuri la pacienți tratați cu Gen 2. Rata de control al bolii (DCR) a fost 78%. Timpul până la răspuns a fost similar cu grupul 1. Un pacient (pacientul 3) cu boală progresivă (PD) ca cel mai bun răspuns nu a fost inclus în grafic.

Figura 113 reprezintă modificarea procentuală a sumei diametrelor. Pacientul 9 nu a avut evaluare a bolii post-LN-144 din cauza decesului legat de melanom înainte de ziua 42. Ziua -14: modificarea % a sumei diametrelor de la screening la referință (ziua -14). Ziua -14 până în ziua 126: modificarea % a SOD de la referință. Ziua -14 = referință. ziua 0 = perfuzie LN-144.

55 La tratamentul TIL, s-a observat o creștere a HMGB1 (Figura 114). Nivelurile HMGB1 plasmatică s-au măsurat folosind kitul HMGB1 ELISA (Tecan US, Inc). Datele indicate reprezintă modificarea nivelurilor HMGB1 pre (ziua -7) și post (ziua 4 și ziua 14) perfuzie LN-144 la pacienți din grupul 1 și grupul 2 (valorile p s-au calculat folosind testul t împerecheat bidimensional pe baza datelor transformate logaritmice). Dimensiunea probelor (aldine și italice) și valorile medii (italice) sunt indicate în paranteze

pentru fiecare interval. HMGB1 este secretat de celule imune activate și eliberat de celule tumorale deteriorate. Nivelurile HMGB1 mărite după tratament cu LN-144 sugerează așadar un mecanism mediat imunitar al activității anti-tumorale.

Nivelurile IP-10 plasmatică s-au măsurat folosind testul Luminex. Datele indicate în Figura 115 reprezintă modificarea nivelurilor IP-10 pre (ziua -7) și post (ziua 4 și ziua 14) perfuzie LN-144 la pacienții din grupul 1 și grupul 2 (valorile p s-au calculat folosind testul t împerecheat bidimensional pe baza datelor transformate logaritmice). Dimensiunea probelor (aldine și italice) și valorile medii (italice) sunt indicate în paranteze pentru fiecare interval. Creșterea post-LN-144 a IP-10 este monitorizată pentru a înțelege posibila corelare cu persistența TIL.

Datele actualizate din grupul 2 (n = 17 pacienți) sunt raportate în Figura 116 - Figura 121. În comparație cu grupul 1 și o aplicare a procesului Gen 1, care au prezentat DCR de 64% și o rată generală de răspuns (ORR) de 29% (N = 14), grupul 2 și o aplicare a procesului Gen 2 au prezentat DCR de 80% și ORR de 40% (N = 10).

Concluzii

Rezultatele preliminare din datele existente demonstrează siguranță comparabilă între producții TIL LN-144 Gen 1 și Gen 2. Administrarea TIL preparate cu procesul Gen 2 (procesul 2A, descris în prezenta) duce la răspunsuri clinice mărite în mod surprinzător observate la pacienți cu melanom metastatic avansat, toți prezentând avansare la terapiile anti-PD-1 și anti-CTLA-4 anterioare. DCR pentru grupul 2 a fost 78%.

Datele de biomarkeri preliminare susțin mecanismul citolitic de acțiune propus pentru terapia TIL.

Aplicarea procesului de producție Gen 2 descris în prezenta durează 22 de zile. Acest proces scurtează semnificativ durata de așteptare a unui pacient pentru a primi TIL, conferă flexibilitate în programarea dozajului pacienților și determină o scădere a costului de producție, asigurând și alte avantaje față de metodele anterioare care permit comercializarea și autorizarea agențiilor de reglementare sanitare. Datele clinice preliminare din melanomul metastatic folosind o aplicare a procesului Gen 2 indică de asemenea o îmbunătățire surprinzătoare a eficienței clinice a TIL, măsurată prin DCR, ORR și alte răspunsuri clinice, cu un timp similar de răspuns și profil de siguranță similar comparativ cu TIL produse folosind procesul Gen 1. Eficiența neașteptată de îmbunătățită a produsului TIL Gen 2 este demonstrată de asemenea de o creștere de peste cinci ori a producției IFN- γ (Figura 98), care se corelează cu eficiența îmbunătățită în general (Figura 122), policlonalitate îmbunătățită semnificativ (Figura 99A și Figura 99B) și producție IP-10 și MCP-1 medie mai mare (Figura 123 - Figura 126). În mod surprinzător, în ciuda procesului Gen 2 mult mai scurt, multe alte caracteristici esențiale ale produsului TIL sunt similare cu cele observate folosind procese mai tradiționale, inclusiv lungimea relativă a telomerilor (Figura 97) și expresia CD27 și CD28 (Figura 96B și Figura 96C).

Referințe

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].

EXEMPLUL 29: STUDIUL HNSCC ȘI CARCINOM DE COL UTERIN FAZA 2

Înscriere în studiul HNSCC (carcinom cu celule scuamoase la cap și gât; C-145-03) faza 2. 13 pacienți și-au dat consimțământul, s-au recoltat TIL de la 10 pacienți și în cele din urmă 7 pacienți au primit tratament, încă unul fiind în curs de tratare.

Înscriere în studiul de carcinom de col uterin faza 2 (C-145-04). 8 pacienți și-au dat consimțământul, s-au recoltat TIL de la 4 pacienți și în cele din urmă 2 pacienți au primit tratament, încă doi fiind în curs de tratare.

Datele inițiale din studiul în desfășurare sunt indicate în Figura 127. S-a observat boală stabilă (SD) și/sau răspuns progresiv la pacienții cu HCNSCC și cancer de col uterin tratați cu terapie TIL până la 84 de zile.

Exemplele de mai sus sunt prezentate pentru o divulgare și o descriere completă a modului de preparare și utilizare a aplicărilor compozițiilor, sistemelor și metodelor din invenție, fără a limita sfera de acoperire a invenției.

Secvențe:

SEQ ID NO:1 este secvența aminoacidică a lanțului greu la muromonab.
SEQ ID NO:2 este secvența aminoacidică a lanțului ușor al muromonab.
SEQ ID NO:3 este secvența aminoacidică a unei proteine umane recombinante IL-2.

SEQ ID NO:4 este secvența aminoacidică a aldesleukinei.
 SEQ ID NO:5 este secvența aminoacidică a unei proteine umane recombinante IL-4.
 SEQ ID NO:6 este secvența aminoacidică a unei proteine umane recombinante IL-7.
 SEQ ID NO:7 este secvența aminoacidică a unei proteine umane recombinante IL-15.
 5 SEQ ID NO:8 este secvența aminoacidică a unei proteine umane recombinante IL-21.
 Secvențele aminoacidice ale muromonab.

Denumire	Secvență (simboluri de aminoacizi de o litruă)
SEQ ID NO:1 lanțul greu muromonab	QVQIQGGQAR LARFQAVVEM AKKASGYTET RYTMKRVKQK PQQLPWTGY TNPSSRYTNY 60 NQKFKDHDAL TTERSSSTAY MGLSLSLSEK SAMVYDAPYV DQHYQDGYWG QQTTLGVSSA 120 KQYARHVVPL APVGGSTTGS SVTLGCLNKG YFHEPVVLMV NQGLSSGVK TFPVAVLQGL 180 YLSSSVTVV SSTRPQSSLE CNVSRFASST KVEKSTSRK KSCDKTRKCP PCPAPFELLS 240 PAVLLEPKK KETLMDHRTF EYTKVYVNVN RDEEVKSNW YVDAEVVHNS NTPPKRQVYN 300 STYRVYVNLV VLKQDLNKG EYKQVSNKA LAAPLKKLIS KAKYHFFKQ VYTFPYSRDE 360 LTRKQVALIC LVMGFYPSDT AVKWRNQQP ERHVTETFFV LQSDGSEFLY SKLTVNKRNV 420 QGHNVTGCV NHRALNNHYT QKSLSLSPK 450
SEQ ID NO:2 lanțul ușor muromonab	QIVLQSPAT MSASPEKVT MTCASGSEVH YMNWQQKSG TSPKRWYET SKLASEVPAH 60 PRGSGSCTSY SLTISGMEAE DAATYVQGVN SSNEFTPQSG TRKEENRADT APIVSIEDPS 120 SEQLTGGAS VYKELNNFVY KDINVKKILS GSERQNGVLE SWTDQSKKDS TYSNSETLTL 180 TRDEVKRNNS YTCGAIKKG TSPVAVKSNR NSG 213

Secvențele aminoacidice ale interleukinelor.

Denumire	Secvență (simboluri de aminoacizi de o litruă)
SEQ ID NO:3 IL-2 umană recombinantă (rhIL-2)	NAPTSSSTKK TQLQRFHLID QILKILNGIN NKNPKLIRM LSEKPYRREK ATELKHLQGL 60 EELKPLEEV LNLQAGHNF LNERDLISNE NVIVLELKGK EEFMVEYAL ETATIVVEFLN 120 RWITFCQSTI STLP 134
SEQ ID NO:4 Aldesleukina	PTSSSTKKTQ LQHEHLIDQ QMILNGLNIN RNEKILTRHIL PFPYMKKAT EIKHLQGLER 60 EIKPFEVEM LAQKQVHPL PRDLSENNV IVALKQGET TPKDRYADRT ATIVVEFLNRW 120 ITFSQLEST LT 132
SEQ ID NO:5 IL-4 umană recombinantă (rhIL-4)	MHRCDITLQF ITRTLNHLF QKTCCTELTV TDTFAAKNT TERETSCRAK TVLRQFYSHE 60 EKDRQLGAT AQQERAKQL IRFDLMLDM LWCLAGLNSC PVLEAHQSTL ENFLERLKI 120 MREKNSKSS 130
SEQ ID NO:6 IL-7 umană recombinantă (rhIL-7)	MDQDFRSGDG KQYRAVIVS IDQLDSMKE EGSHCLNNEF NFFKRLICDA NKEGMLFPA 60 KRKLQGLDM HSTGDEDLKL LKVSGETTLE LNKITQYVGR KPAALGSAQF TKSLEENKGL 120 KEQRINDEL FLNRLQETK TOWNKIMGT KES 133
SEQ ID NO:7 IL-15 umană recombinantă (rhIL-15)	MNFVHISL KKIETLQEM HIDATLNTES DVRESCKVTM MRCFLELQV TSLSSGDAST 60 SDTVENLIL ANNSLSSMN VTESCKRECE ELREKIHDF LQSPVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 IL-21 umană recombinantă (rhIL-21)	MQDRMIRM QLIDIVDQK NYVHDLVPEF LPAPEDVETM CEWSAFSCFQ KQKLKSAHTG 60 NNERLINVSI KKLKRRKFSST NAGREKRRRL TQFSCFSYEN KPKKFLERF KLLQEMIHQ 120 HLSRTEHSE DS 130

10

<110> IOVANCE BIOTHERAPEUTICS, INC

Bender, James
 Wardell, Seth Lotze,
 Michael T.

<120> PROCESE DE PRODUCȚIE A LIMFOCITELOR INFILTRANTE ÎN TUMORI ȘI UTILIZĂRILE ACESTORA ÎN IMUNOTERAPIE

<130> 116983-5017

<150> 62/478,506

<151> 2017-03-29

<150> 62/539,410

<151> 2017-07-31

<150> 62/548,306

<151> 2017-08-21

<150> 62/554,538

<151> 2017-09-05

<150> 62/559,374
 <151> 2017-09-15
 <150> 62/567,121
 <151> 2017-10-02
 <150> 62/577,655
 <151> 2017-10-26
 <150> 62/582,874
 <151> 2017-11-07
 <150> 62/596,374 <151>
 2017-12-08

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secvența artificială

<220>

<223> Lanțul greu muromonab

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 130 135 140

MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

160

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
 180 185 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

161

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
450

<210> 2
<211> 213
<212> PRT
<213> Secvența artificială

<220>
<223> Lanțul ușor muromonab

<400> 2

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro
 100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly

MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

162

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 3

<211> 134

<212> PRT

<213> Secvența artificială

<220>

<223> IL-2 umană recombinantă (rhIL-2)

<400> 3

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95

MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

163

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 132
<212> PRT
<213> Secvența artificială

<220>
<223> Aldesleukina

<400> 4

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125

Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
<211> 130

MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

164

<212> PRT

<213> Secvența artificială

<220>

<223> IL-4 umană recombinantă (rhIL-4)

<400> 5

Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp
 20 25 30

Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg
 35 40 45

Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr
 50 55 60

Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu
65 70 75 80

Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly
 85 90 95

Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn
 100 105 110

Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys
 115 120 125

Ser Ser

130

<210> 6

<211> 153

<212> PRT

<213> Secvența artificială

<220>

<223> IL-7 umană recombinantă (rhIL-7)

<400> 6

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val 1 5
10 15

MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

165

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
20 25 30

Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
35 40 45

Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
50 55 60

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
65 70 75 80

Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
85 90 95

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
100 105 110

Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
115 120 125

Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
130 135 140

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> Secvența artificială

<220>

<223> IL-15 umană recombinantă (rhIL-15)

<400> 7

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val

MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

166

50 55 60
Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 100 105 110

Asn Thr Ser
115

<210> 8
<211> 132
<212> PRT
<213> Secvența artificială

<220>
<223> IL-21 umană recombinantă (rhIL-21)

<400> 8

Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val
1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro
 20 25 30

Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys
 35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg
 50 55 60

Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr
65 70 75 80

Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp
 85 90 95

Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser
 100 105 110

Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly
 115 120 125

MD/EP 3730608 T2 2025.03.31

167

Ser Glu Asp Ser
130

<210> 9
<211> 18
<212> ADN
<213> Secvența artificială

<220>
<223> FITC-conjugated Telomere PNA probe
<400>

9
ccctaacct aacctaa 18

<210> 10
<211> 39
<212> ADN
<213> Secvența artificială

<220>
<223> Tel-1b primer
<400>

10
cggtttggtt gggttggt ttgggttg gttgggtt 39

<210> 11
<211> 39
<212> ADN
<213> Secvența artificială

<220>
<223> Tel-2b primer
<400>

11
ggettgcctt accttacc ttaccttac cttacct 39

<210> 12
<211> 27
<212> ADN
<213> Secvența artificială

<220>
<223> hgb1 primer
<400>

12
gettctgaca caactgtgt cactage 27

<210> 13
<211> 23
<212> ADN
<213> Secvența artificială

<220>

<223> hgb2 primer

<400>

13

caccaacttc atccacgttc acc

23

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- M. DONIA ET AL: "Characterization and Comparison of 'Standard' and 'Young' Tumour-Infiltrating Lymphocytes for Adoptive Cell Therapy at a Danish Translational Research Institution: Characterization and Comparison of 'Standard' and 'Young' TILs", SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 75, no. 2, 1 February 2012 (2012-02-01), GB, pages 157 - 167, XP055560924, ISSN: 0300-9475, DOI: 10.1111/j.1365-3083.2011.02640.x
- WO-A1-2013/057500
- M. J. BESSER ET AL: "Clinical Responses in a Phase II Study Using Adoptive Transfer of Short-term Cultured Tumor Infiltration Lymphocytes in Metastatic Melanoma Patients", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 16, no. 9, 20 April 2010 (2010-04-20), US, pages 2646 - 2655, XP055448438, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0041
- WO-A1-2013/088147
- KHOI Q. TRAN ET AL: "Minimally Cultured Tumor-infiltrating Lymphocytes Display Optimal Characteristics for Adoptive Cell Therapy", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 31, no. 8, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 742 - 751, XP055031158, ISSN: 1524-9557, DOI: 10.1097/CJI.0b013e31818403d5
- WO-A1-2016/053338
- US-A1- 2011 052 530
- US-A1- 2012 244 133

(57) Revendicări:

1. O metodă de expansiune a limfocitelor infiltrante în tumori (TIL) într-o populație terapeutică de TIL cuprinzând:

(a) adăugarea fragmentelor tumorale procesate cuprinzând o primă populație de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect într-un sistem închis;

(b) efectuarea unei prime expansiuni prin cultivarea primei populații de TIL într-un mediu de cultură celulară cuprinzând IL-2 pentru a produce o a doua populație de TIL, unde prima expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o primă suprafață permeabilă la gaz, unde prima expansiune se efectuează timp de 3-11 zile pentru a obține a doua populație de TIL, unde a doua populație de TIL are un număr de cel puțin 50 de ori mai mare decât prima populație de TIL și unde tranziția de la etapa (a) la etapa (b) are loc fără deschiderea sistemului;

(c) efectuarea unei a doua expansiuni prin suplimentarea mediului de cultură celulară al celei de-a doua populații de TIL cu IL-2 suplimentar, OKT-3 și celule de prezentare a antigenului (APC), pentru a produce o a treia populație de TIL, unde a doua expansiune se efectuează timp de 7-11 zile pentru a obține a treia populație de TIL, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL, unde a doua expansiune se efectuează într-un recipient închis care asigură o a doua suprafață permeabilă la gaz și unde tranziția de la etapa (b) la etapa (c) are loc fără deschiderea sistemului;

(d) recoltarea celei de-a treia populații de TIL obținute de la etapa (c), unde tranziția de la etapa (c) la etapa (d) are loc fără deschiderea sistemului;

(e) transferul celei de-a treia populații de TIL recoltate de la etapa (d) într-o pungă de perfuzie, unde transferul de la etapa (d) la etapa (e) are loc fără deschiderea sistemului; și

(f) crioconservarea pungii de perfuzie cuprinzând populația TIL recoltată de la etapa (e) folosind un proces de crioconservare, unde populația terapeutică de TIL recoltată în etapa (d) cuprinde suficiente

TIL pentru un dozaj terapeutic eficient al TIL, unde metoda cuprinde evaluarea TIL cu privire la viabilitate și unde viabilitatea populației terapeutice de TIL după decongelare este mai mare decât sau egală cu 70%.

2. Metoda conform revendicării 1, cuprinzând de asemenea evaluarea TIL crioconservate decongelate cu privire la viabilitate.

3. Metoda conform revendicării 1, unde nu se efectuează o selecție a primei populații de TIL, a celei de-a doua populații de TIL, a celei de-a treia populații de TIL, a populației TIL recoltate și/sau a populației TIL terapeutice în timpul nici uneia dintre etapele (a) până la (f).

4. Metoda conform oricărei revendicări anterioare, unde APC sunt celule mononucleare din sânge periferic (PBMC).

5. Metoda conform revendicării 4, unde PBMC sunt suplimentate la un raport de 1:25 TIL:PBMC.

6. Metoda conform oricăreia din revendicările de la 1 la 5, unde etapele (a) până la (e) se efectuează într-o perioadă de 20 de zile până la 22 de zile.

7. Metoda conform oricăreia din revendicările de la 1 la 5, unde etapele (a) până la (e) se efectuează într-o perioadă de 22 de zile.

8. Metoda conform oricărei revendicări anterioare, unde cancerul este selectat din grupul constând din melanom, cancer ovarian, cancer de col uterin, cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer pulmonar, cancer vezical, cancer mamar, cancer cauzat de papilomavirus uman, cancer la cap și gât (inclusiv carcinom celular scuamos la cap și gât (HNSCC)), cancer renal și carcinom cu celule renale.

9. Metoda conform revendicării 8, unde cancerul este selectat din grupul constând din melanom, HNSCC, cancer de col uterin și NSCLC.

10. Metoda conform revendicării 9, unde cancerul este melanom.

11. Metoda conform revendicării 9, unde cancerul este HNSCC.

12. Metoda conform revendicării 9, unde cancerul este cancer de col uterin.

13. Metoda conform revendicării 9, unde cancerul este NSCLC.

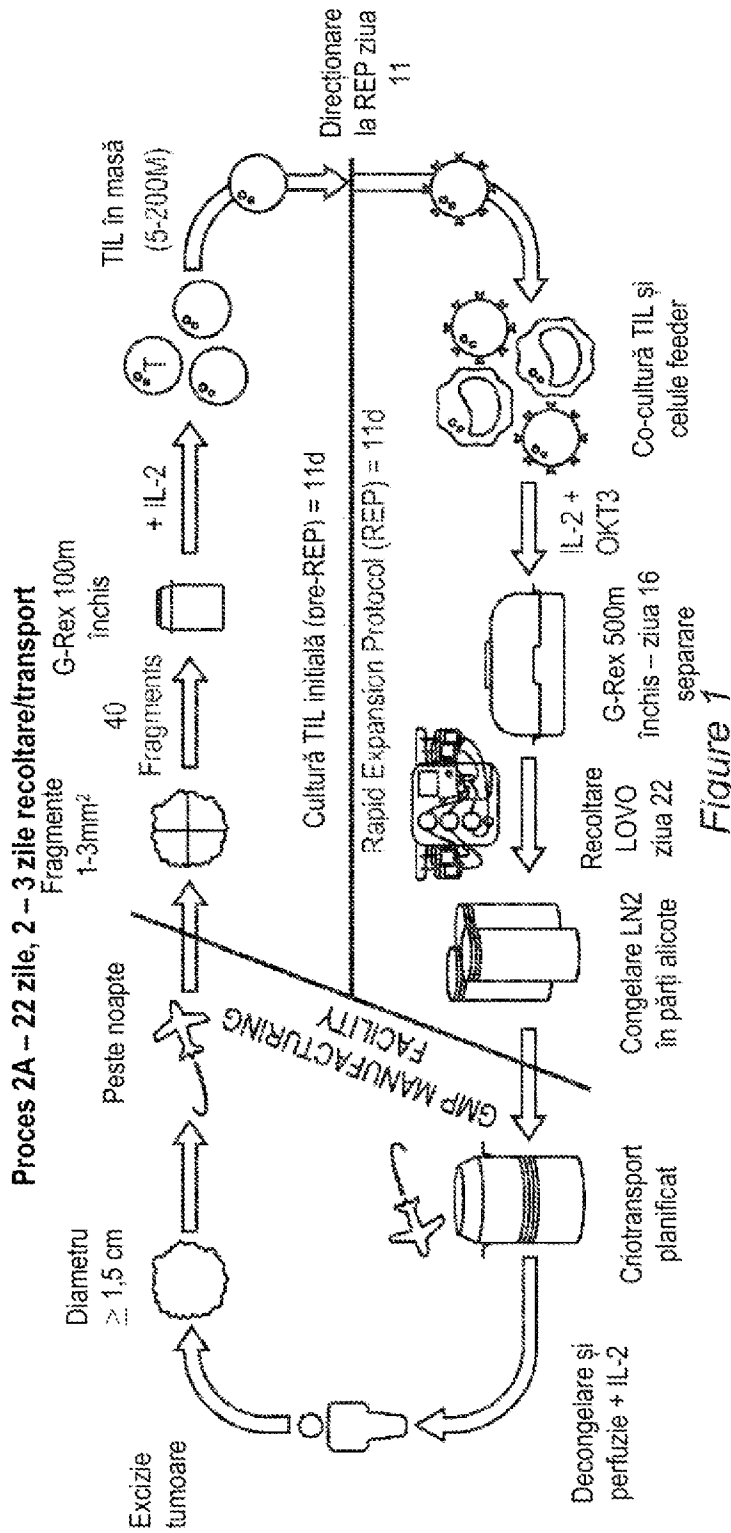
14. Metoda conform oricărei revendicări anterioare, unde, înaintea etapei (a), metoda cuprinde obținerea primei populații de TIL dintr-o tumoare rezecată de la un subiect prin procesarea unei probe tumorale obținute de la subiect în fragmente tumorale multiple.

15. Metoda conform oricărei revendicări anterioare, unde riscul de contaminare microbiană este redus comparativ cu un sistem deschis.

16. Metoda conform oricărei revendicări anterioare, unde a treia populație de TIL este o populație terapeutică de TIL cuprinzând o subpopulație mărită de celule T efectoare și/sau celule T de memorie centrală față de a doua populație de TIL, unde celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute în populația terapeutică de TIL prezintă una sau mai multe caracteristici selectate din grupul constând din expresie CD27+, expresie CD28+, telomeri mai lungi, expresie CD57 mărită și expresie CD56 scăzută față de celulele T efectoare și/sau celulele T de memorie centrală obținute din a doua populație de celule.

17. Metoda conform revendicării 1, unde viabilitatea populației terapeutice de TIL după decongelare este mai mare de 70%.

18. Metoda conform revendicării 1, unde viabilitatea populației terapeutice de TIL după decongelare este mai mare de 86%.



Rapid Expansion Protocol = Protocol expansiune rapidă
GMP MANUFACTURING FACILITY = FACILITATE DE MAUFACTURARE GMP

Dezvoltarea procesului

Etapă	Proces 1C actual	Proces nou 2A	Impact	
Fragmente/zile	1	4 Fragments/10 G-Rex 10-21 Days	40 Fragments/1-G-Rex 100 CS- (x2?) 11 Days	Crește proba tumorală, scurtează cultura, reduce etapele, adaptabil la sistem închis
Congelare ~ testare-decongelare; ziua Direct în REP	2	PreREP Freeze-> Testing -> Thaw- ~Day 27->40e6TIL	Direct To REP- Day 11- <200e6	Scurtează procesul, reduce etapele, elimină testarea
Separare	3	36 G-Rex 100-~Day 30 >5e6TIL - Split ~Day 36	4-5 G-Rex 500CS-TIL- Split Day 16	Reduce etapele, sistem închis, REP mai scurt
Recoltare prin centrifugare; Spătare automată	4	Harvest Day ~43+ Harvesting By Centrifugation	Harvest Day 22 LOVO-Automated Cell Washer	Reduce etapele. automat, sistem închis
Produs proaspăt; crioconservat	5	Fresh Product- Hypothermosol-Single Infusion Bag	Cryopreserved Product-CS10 In LN ₂ Multiple Aliquots	Flexibilitate transport, programare pacienți, testare cu eliberare mai ușoară. teste globale
Timp proces	6	43+ Day Process Time	22 Day Process Time	Revenire la pacient, capacitatea camerei cu atmosferă controlată, COGs

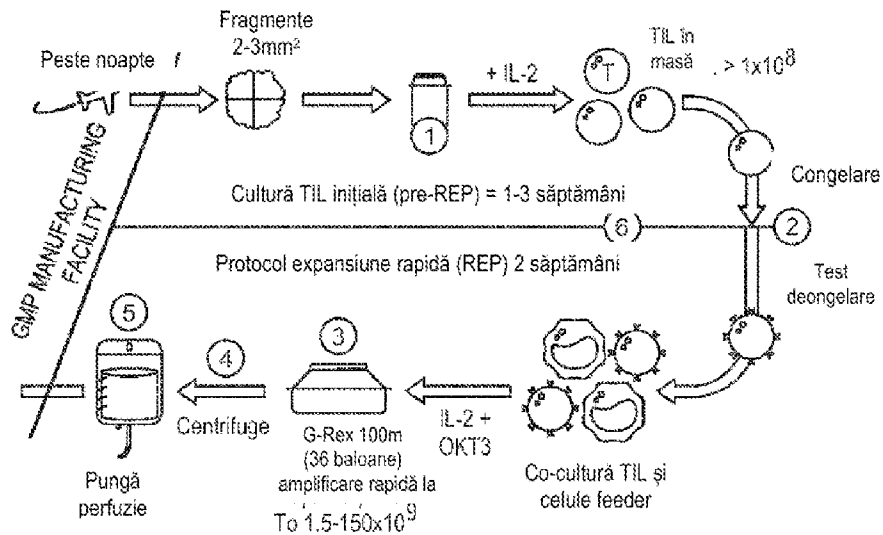


Figure 2

GMP MANUFACTURING FACILITY = FACILITATE DE MANUFACTURARE GMP

Cronologie – proces 1C – proces actual

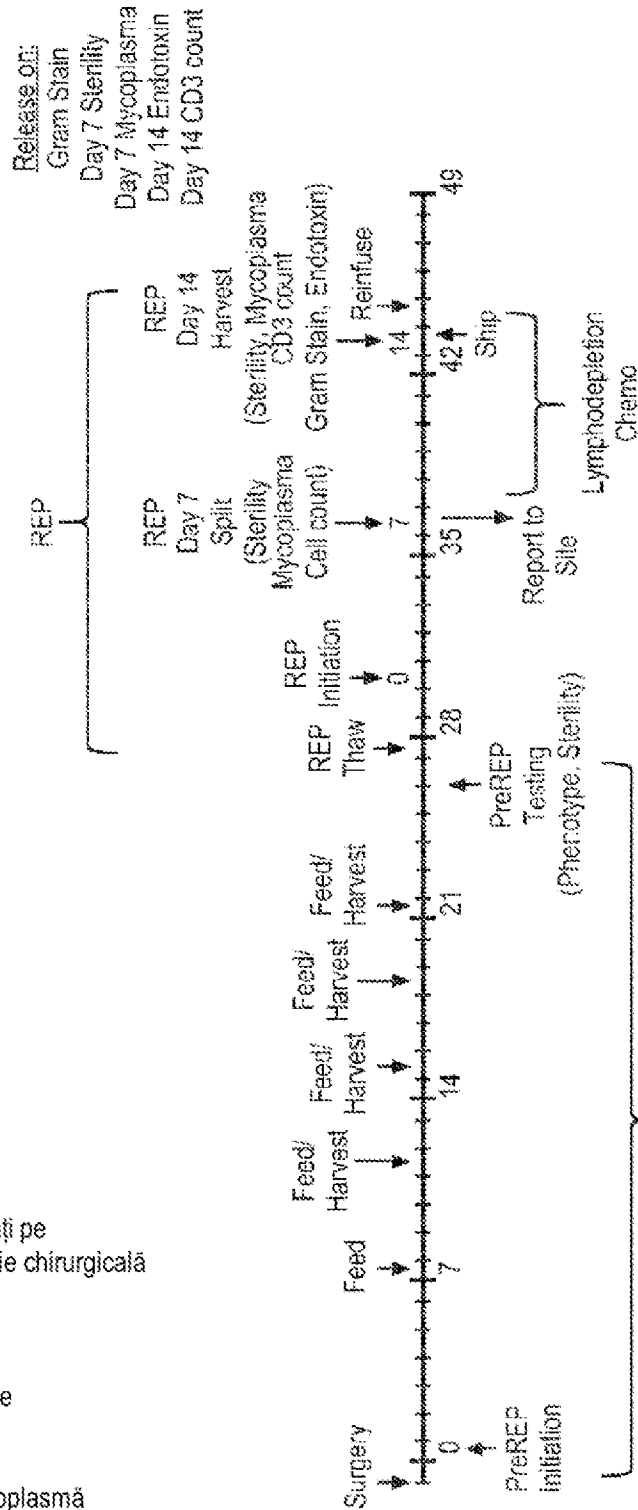
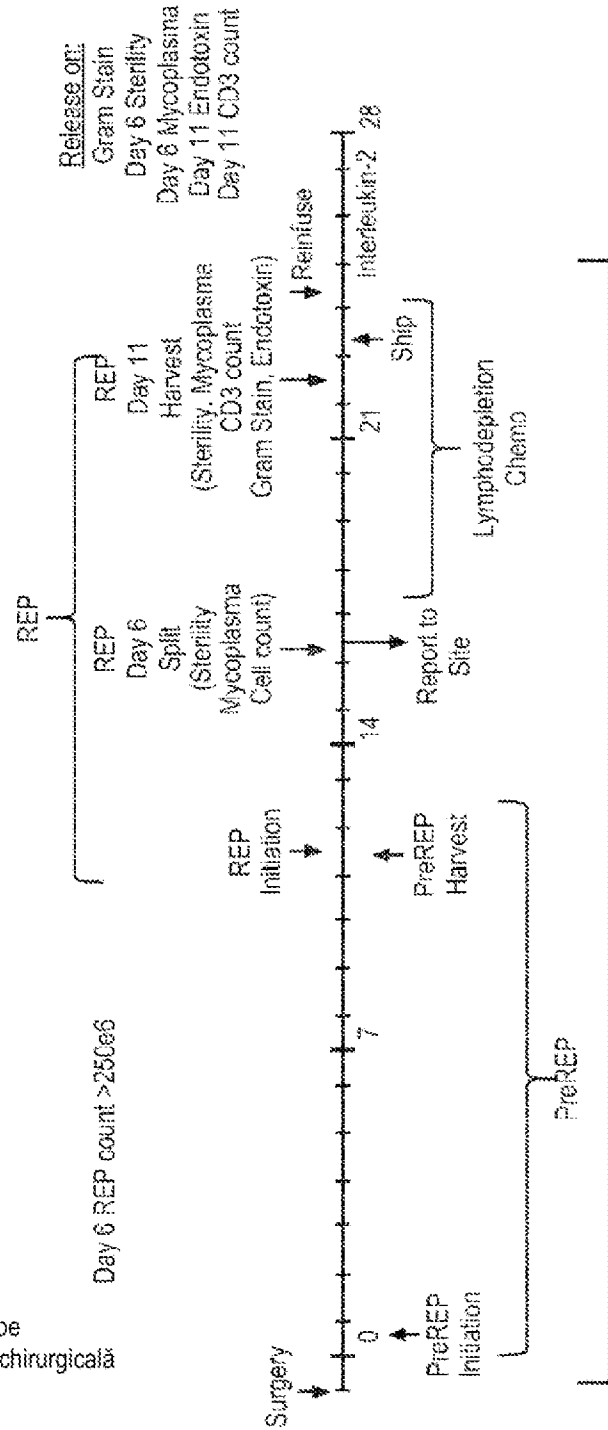


Figure 3

- Release on: eliberați pe
- Surgery = intervenție chirurgicală
- Initiation = inițiere
- Feed = nutritiv
- Harvest = recoltare
- Thaw = decongelare
- Day = ziua
- Sterility = sterilitate
- Mycoplasma = micoplasmă
- Cell count = număr celule
- Gram stain = colorație Gram
- Endotoxin = endotoxina
- Phenotype = fenotip
- Reinfuse = reperfuzie
- Ship = expediere
- Lymphodepletion chemo – chimioterapie limfodepletie

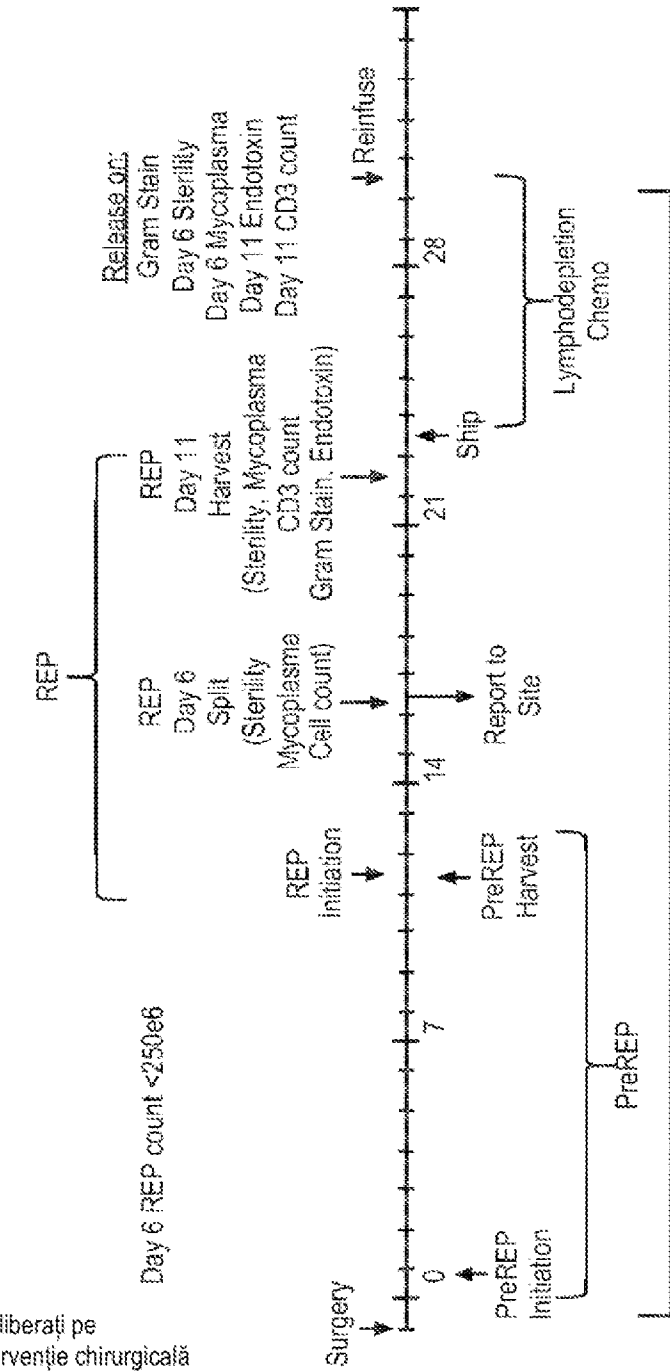
Cronologie Terapie TIL- v2A- ziua 16 REP >250e6



Timp terapie total (operatie - perfuzie) = 25 zile
Figure 4

- Release on: eliberări pe
- Surgery = intervenție chirurgicală
- Initiation = inițiere
- Feed = nutritiv
- Harvest = recoltare
- Thaw = decongelare
- Day = ziua
- Sterility = sterilitate
- Mycoplasma = micoplasmă
- Cell count = număr celule
- Gram stain = colorație Gram
- Endotoxin = endotoxina
- Phenotype = fenotip
- Reinfuse = reperfuție
- Ship = expediere
- Lymphodepletion chemo -- chimioterapie limfodepleție

Cronologie Terapie TIL – v2A – ziua 16 REP >250e6



Timp terapie total (operatiile – perfuzie) = 31 zile
Figure 5

- Release on: eliberati pe
- Surgery = interventie chirurgicala
- Initiation = initiere
- Feed = nutritiv
- Harvest = recoltare
- Thaw = decongelare
- Day = ziua
- Sterility = sterilitate
- Mycoplasma = micoplasmă
- Cell count = număr celule
- Gram stain = coloratie Gram
- Endotoxin = endotoxina
- Phenotype = fenotip
- Reinfuse = reperfuzie
- Ship = expediere
- Lymphodepletion chemo – chimioterapie limfodepletie

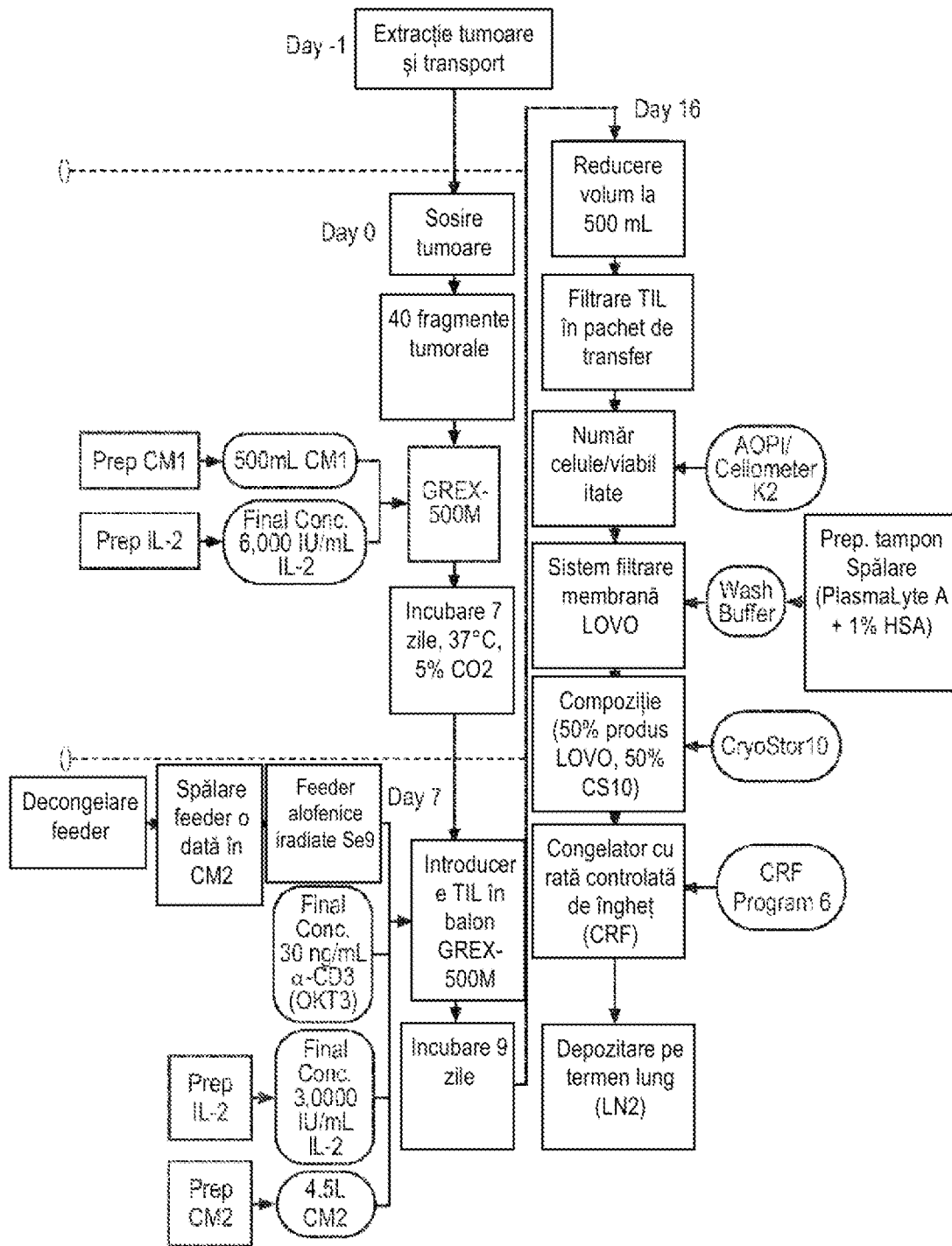


Figure 6

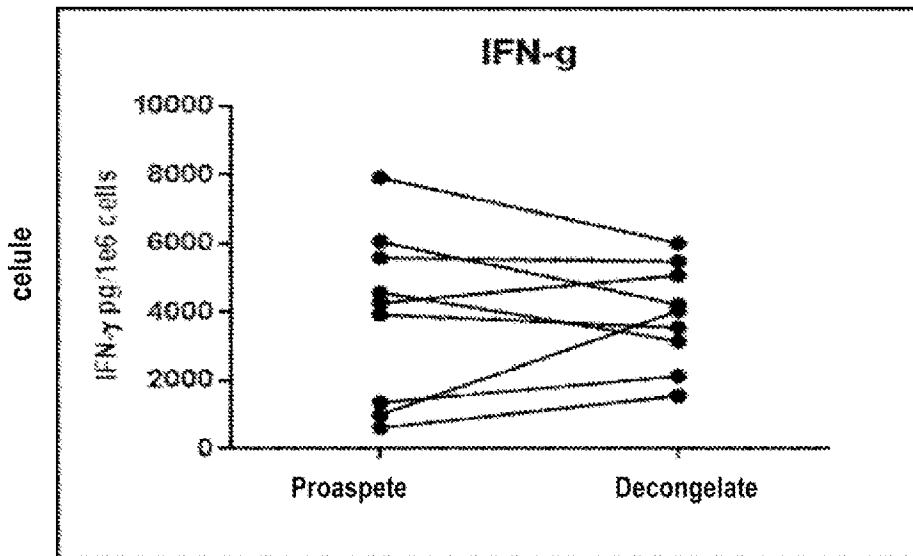
Day = ziua

Final conc. = concentrație finală

Wash buffer = tampon spălare

Figure 7

P value	Valoare p	0.9797
P value summary	Rezumat valoare p	ns
Significantly different? (P < 0.05)	Semnificativ diferit?	No
One- or two-tailed P value?	Valoare p uni sau	Two-tailed
t, df	bidimensională?	t=0.02626 df=8
Number of pairs	Număr perechi	9



How effective was the pairing?

Correlation coefficient (r)

P value (one tailed)

P value summary

Was the pairing significantly effective?

Cât de eficientă a fost împerecherea?

Coeficient de corelare (r)

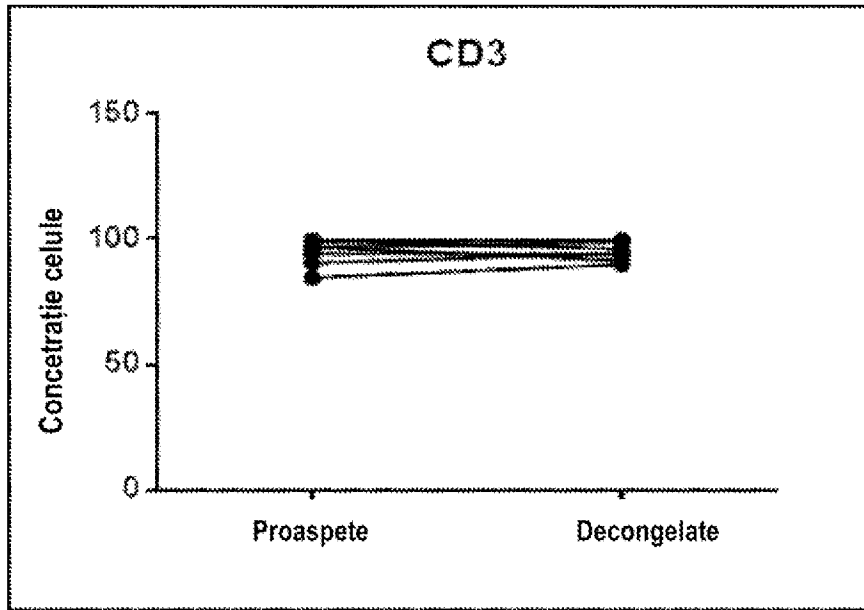
Valoare p (unidimensională)

Rezumat valoare p

A fost împerecherea eficientă semnificativ?

Figure 8

P value summary	Valoare p	ns
Significantly different? (P < 0.05)	Rezumat valoare p	No
One- or two-tailed P value?	Semnificativ diferit?	Two-tailed
t, df	Valoare p uni sau bidimensională?	t=0.8479 df=7
Number of pairs	Număr perechi	8

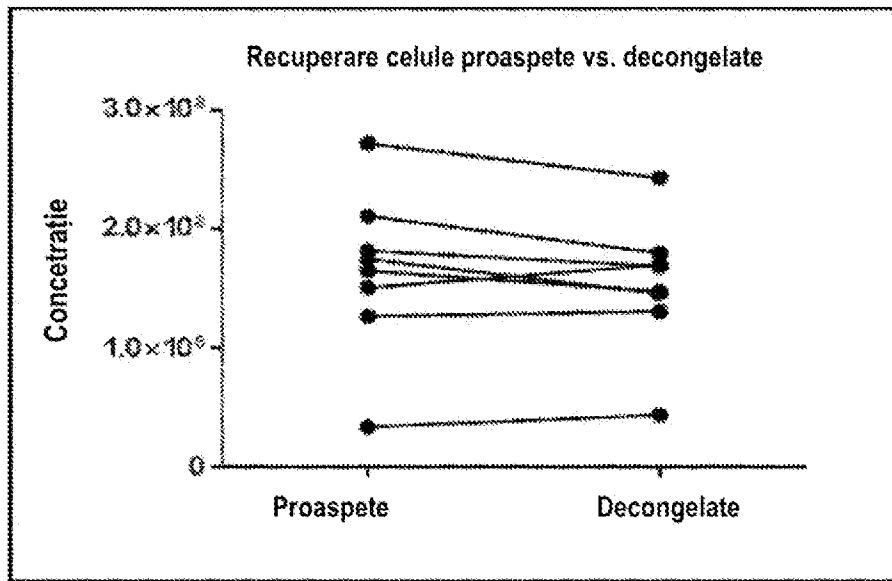


How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0.9711
P value (one tailed)	< 0.0001
P value summary	****
Was the pairing significantly effective?	Yes

Cât de eficientă a fost împerecherea?
 Coeficient de corelare (r)
 Valoare p (unidimensională)
 Rezumat valoare p
 A fost împerecherea eficientă semnificativ?

Figure 9

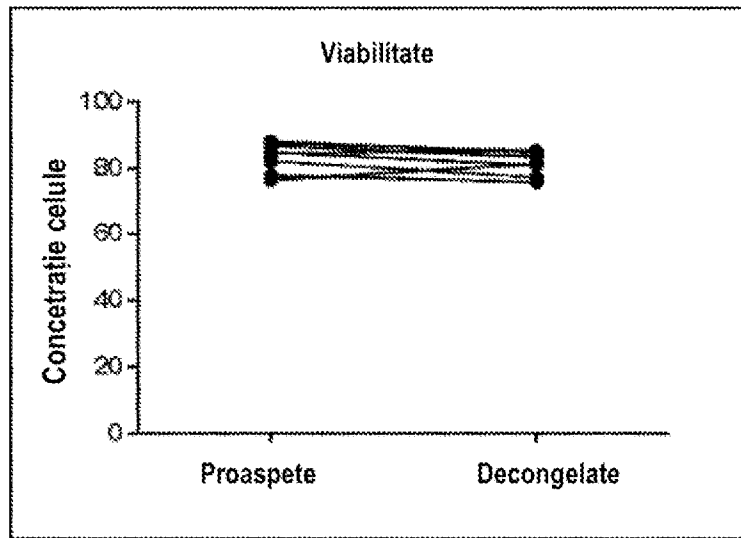
P value summary	Rezumat valoare p	ns
Significantly different? (P < 0.05)	Semnificativ diferit?	No
One- or two-tailed P value?	Valoare p uni sau bidimensională?	Two-tailed
t, df		t= 1.588 df=7
Number of pairs	Număr perechi	8



How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0.7448
P value (one tailed)	0.017
P value summary	*
Was the pairing significantly effective?	Yes
Cât de eficientă a fost împerecherea?	
Coeficient de corelare (r)	
Valoare p (unidimensională)	
Rezumat valoare p	
A fost împerecherea eficientă semnificativ?	

Figure 10

P value summary	Rezumat valoare p	ns
Significantly different? (P < 0.05)	Semnificativ diferit?	No
One- or two-tailed P value?	Valoare p uni sau bidimensională?	Two-tailed
t, df		t=1.596 df=7
Number of pairs	Număr perechi	8



How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0.6932
P value (one tailed)	0.0283
P value summary	*
Was the pairing significantly effective?	Yes

Cât de eficientă a fost împerecherea?
 Coeficient de corelare (r)
 Valoare p (unidimensională)
 Rezumat valoare p
 A fost împerecherea eficientă semnificativ?

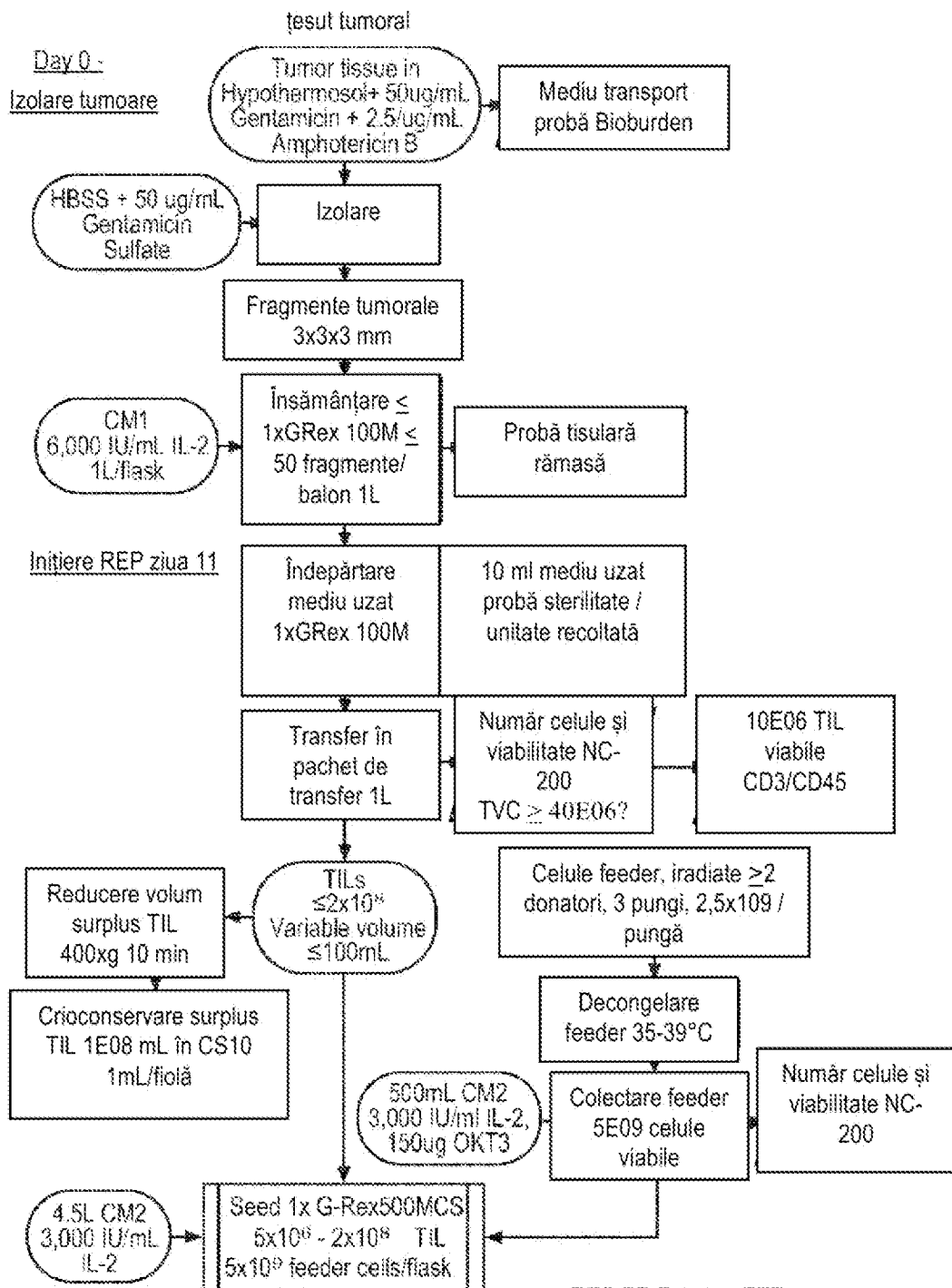
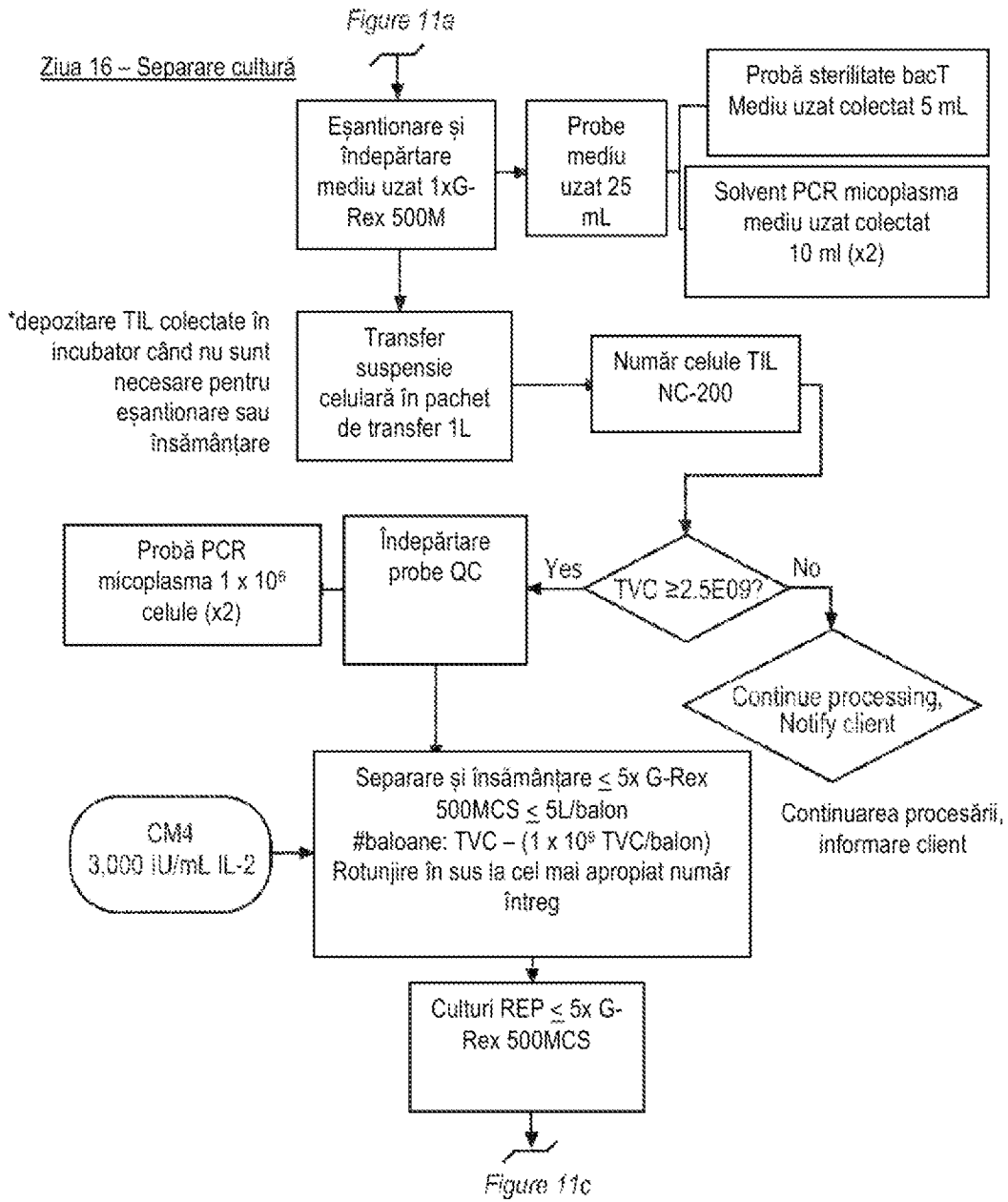
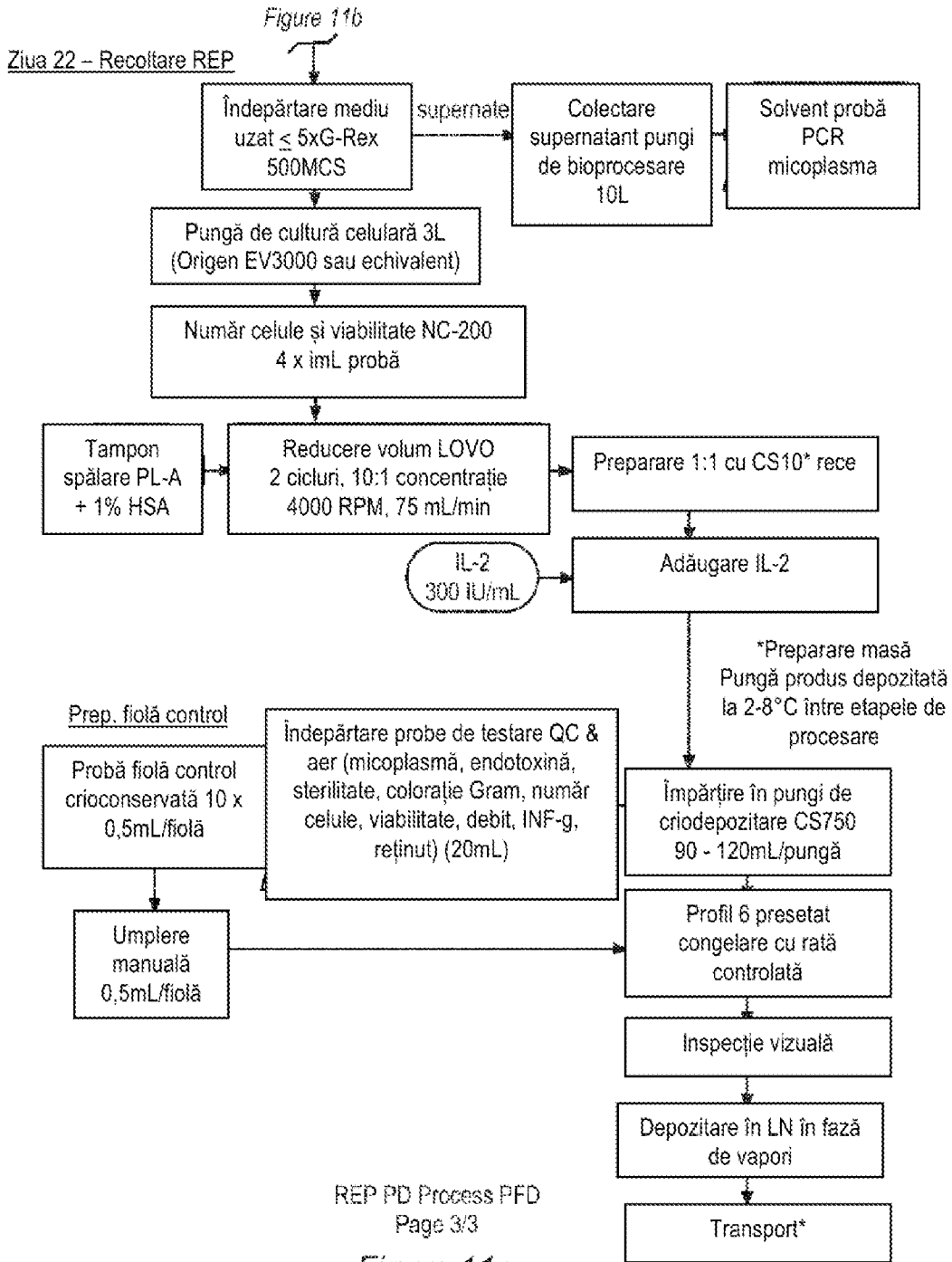


Figure 11b

REP PD Process PFD Page 1/3 Figure 11a

- Day = ziua
- Tumor tissue = Țesut tumoral
- Flask = balon
- Variable volume = volum variabil
- Seed = însămânțare
- Feeder cells = celule feeder





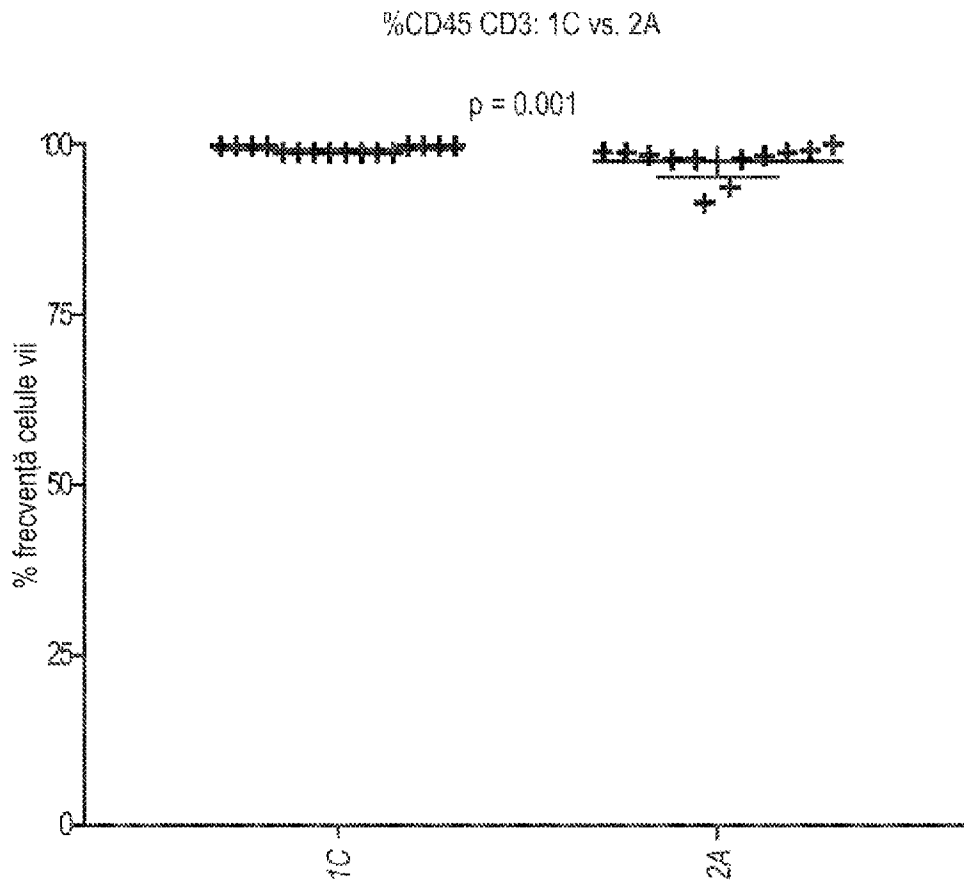
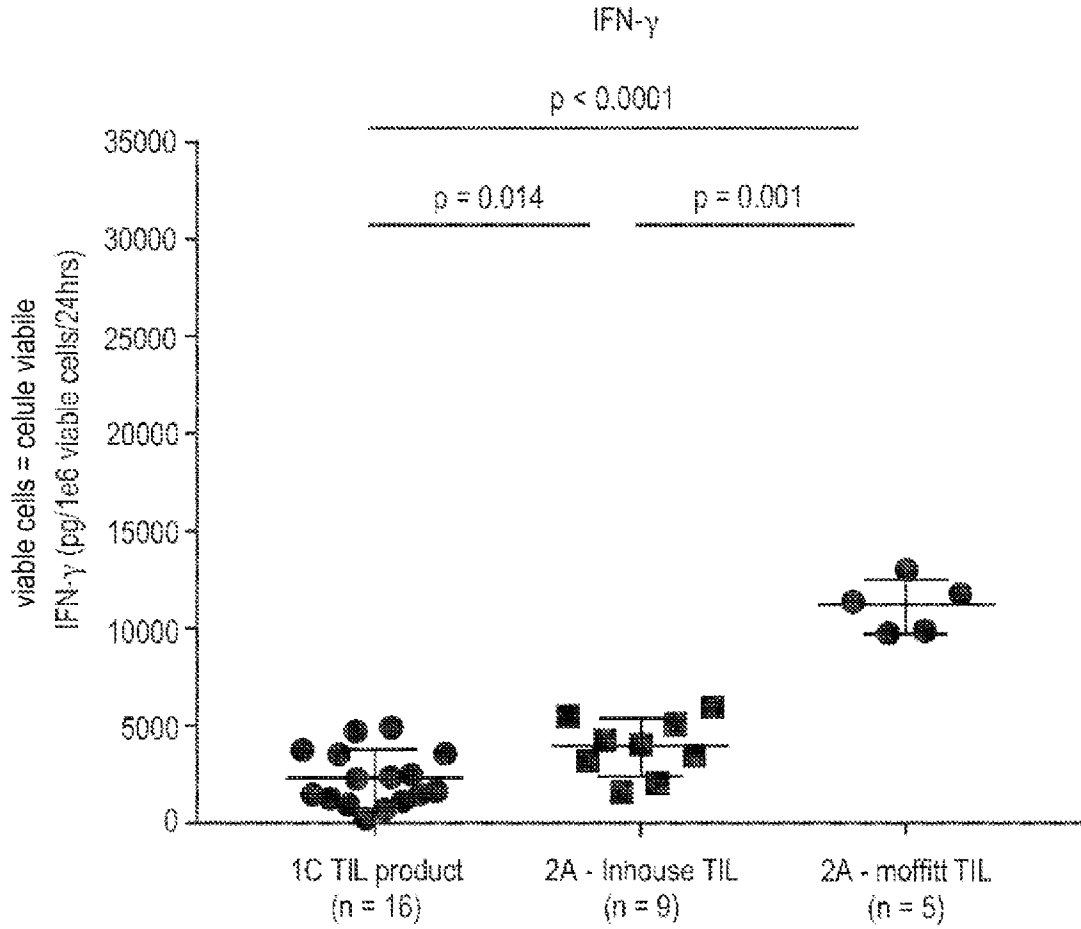
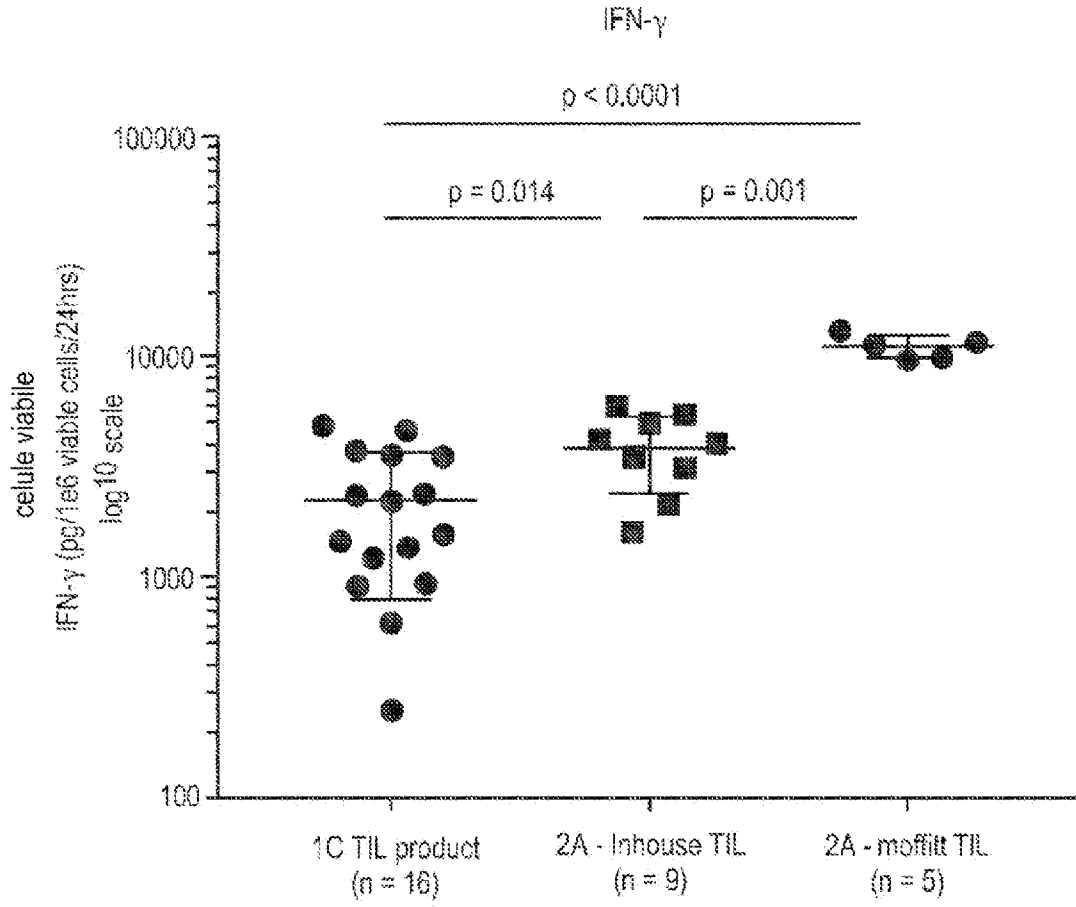


Figure 14



product = produs
inhouse = intern
moffitt = moffitt

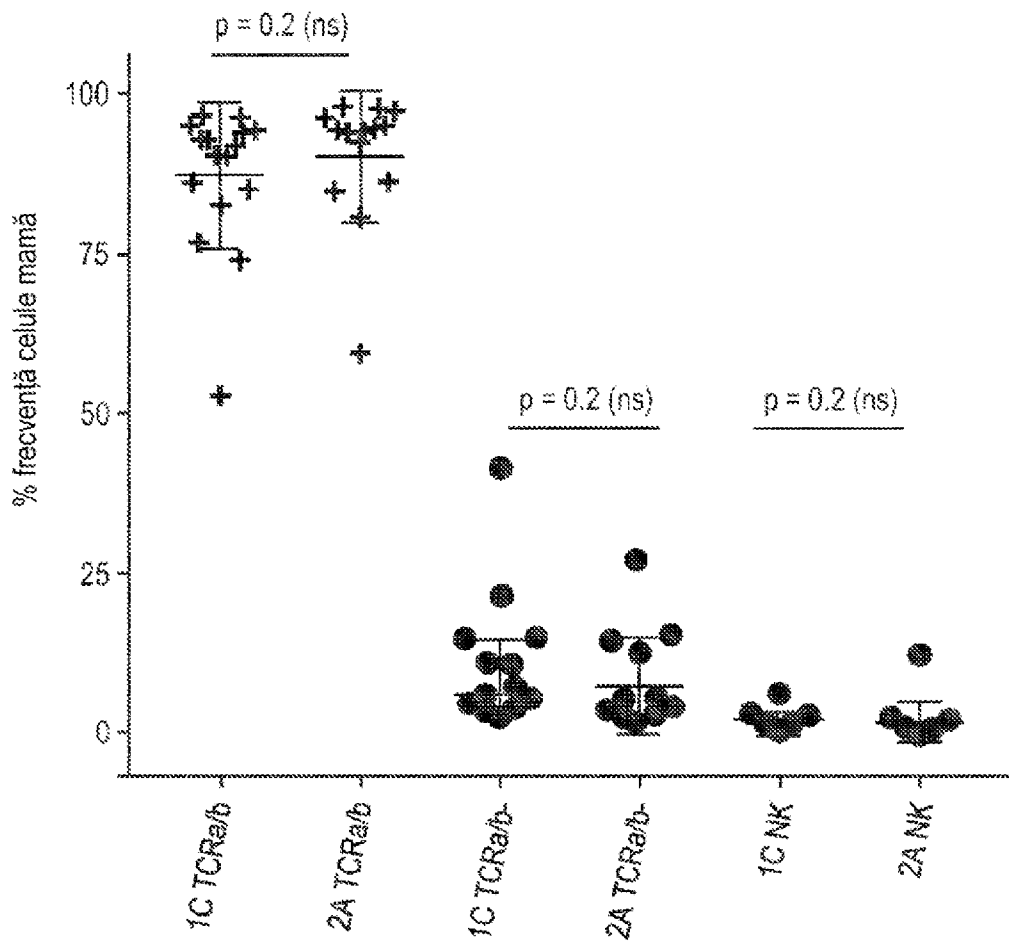
Figure 15



product = produs
inhouse = intern
moffitt = moffitt

Figure 16

TCRa/b and NK: 1C vs. 2A



and = și

Figure 17

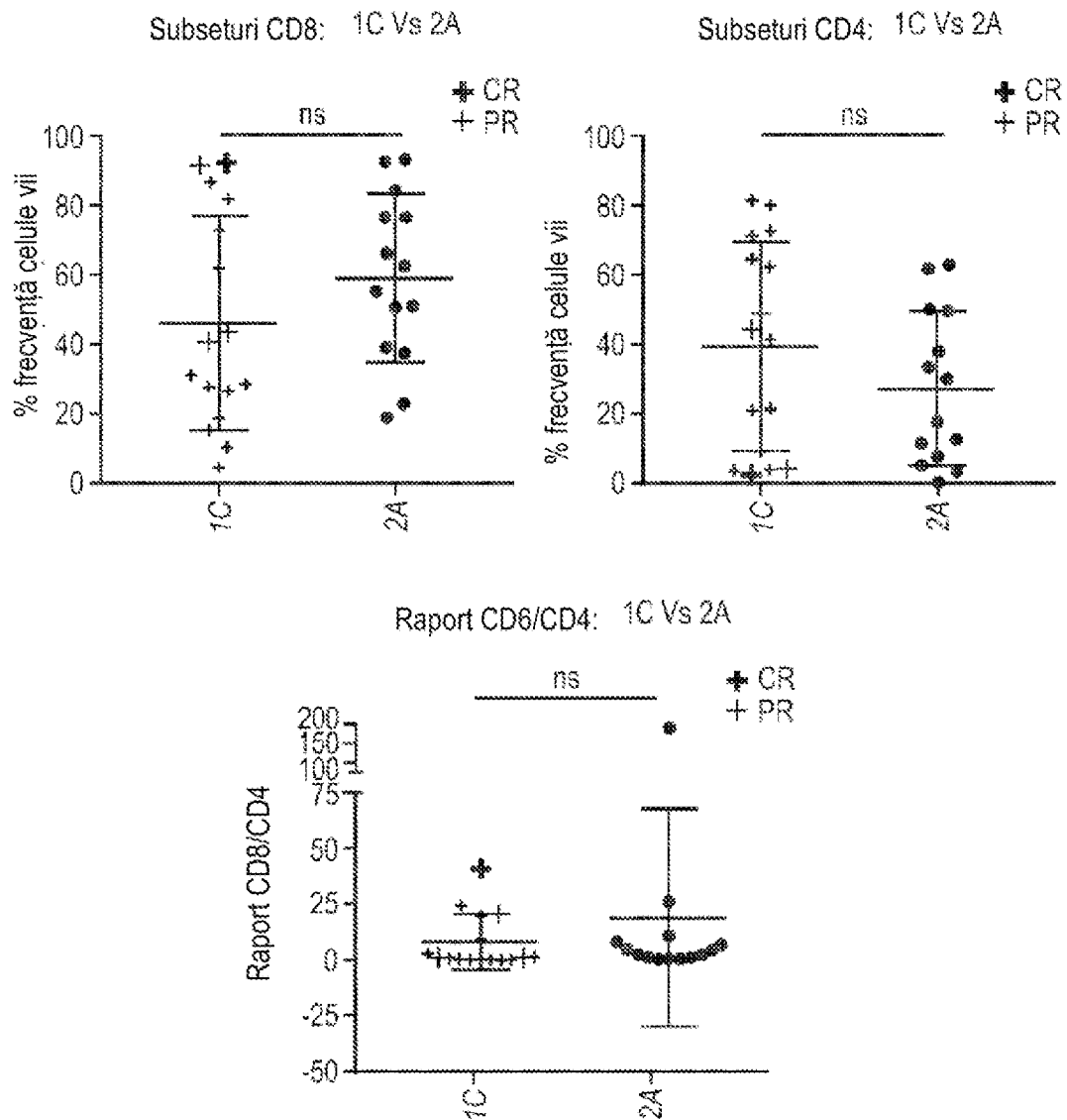


Figure 18

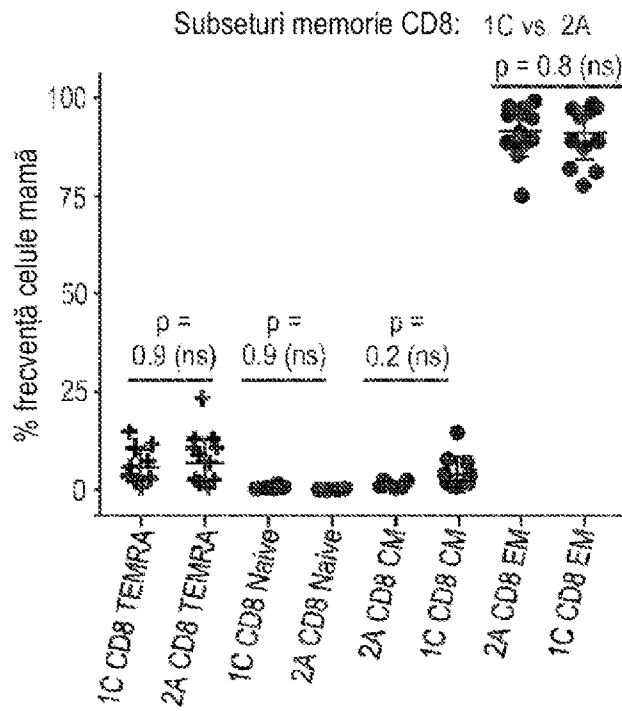
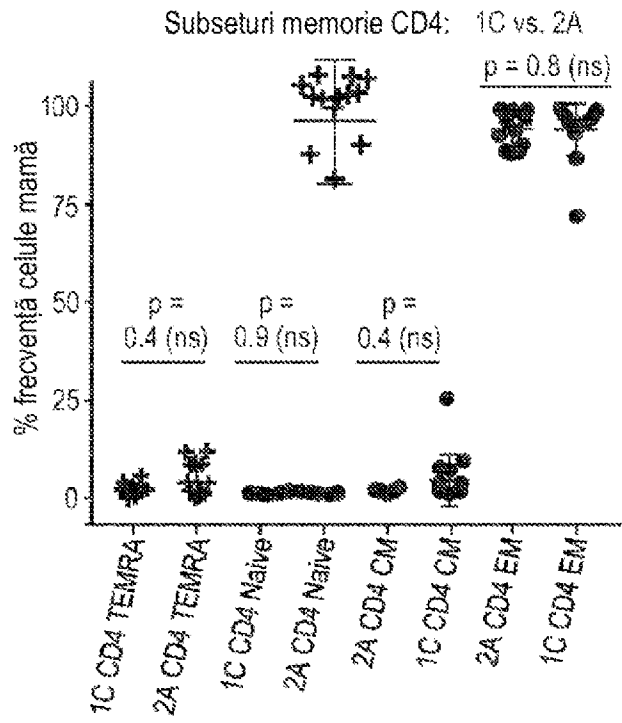


Figure 19

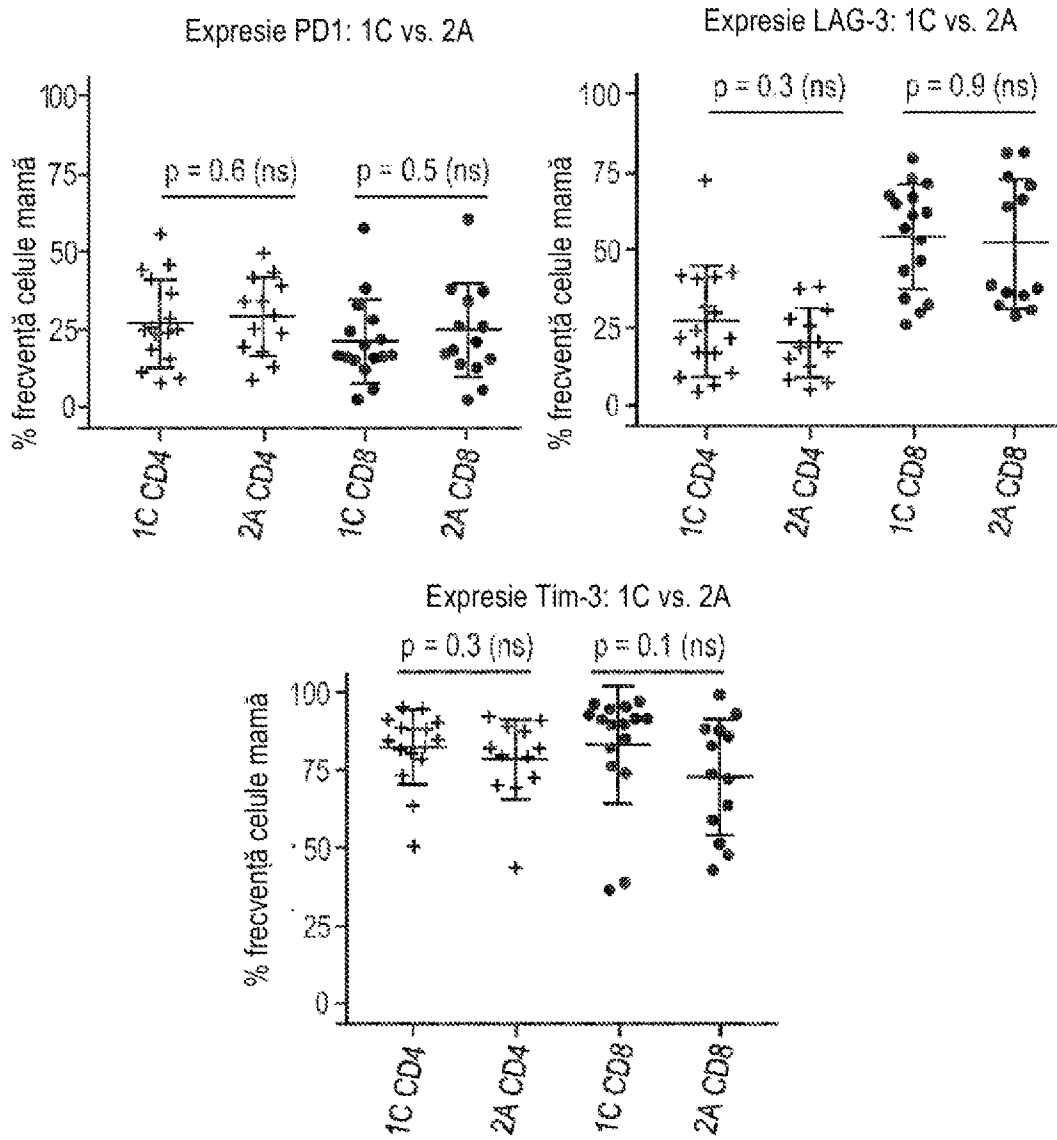


Figure 20

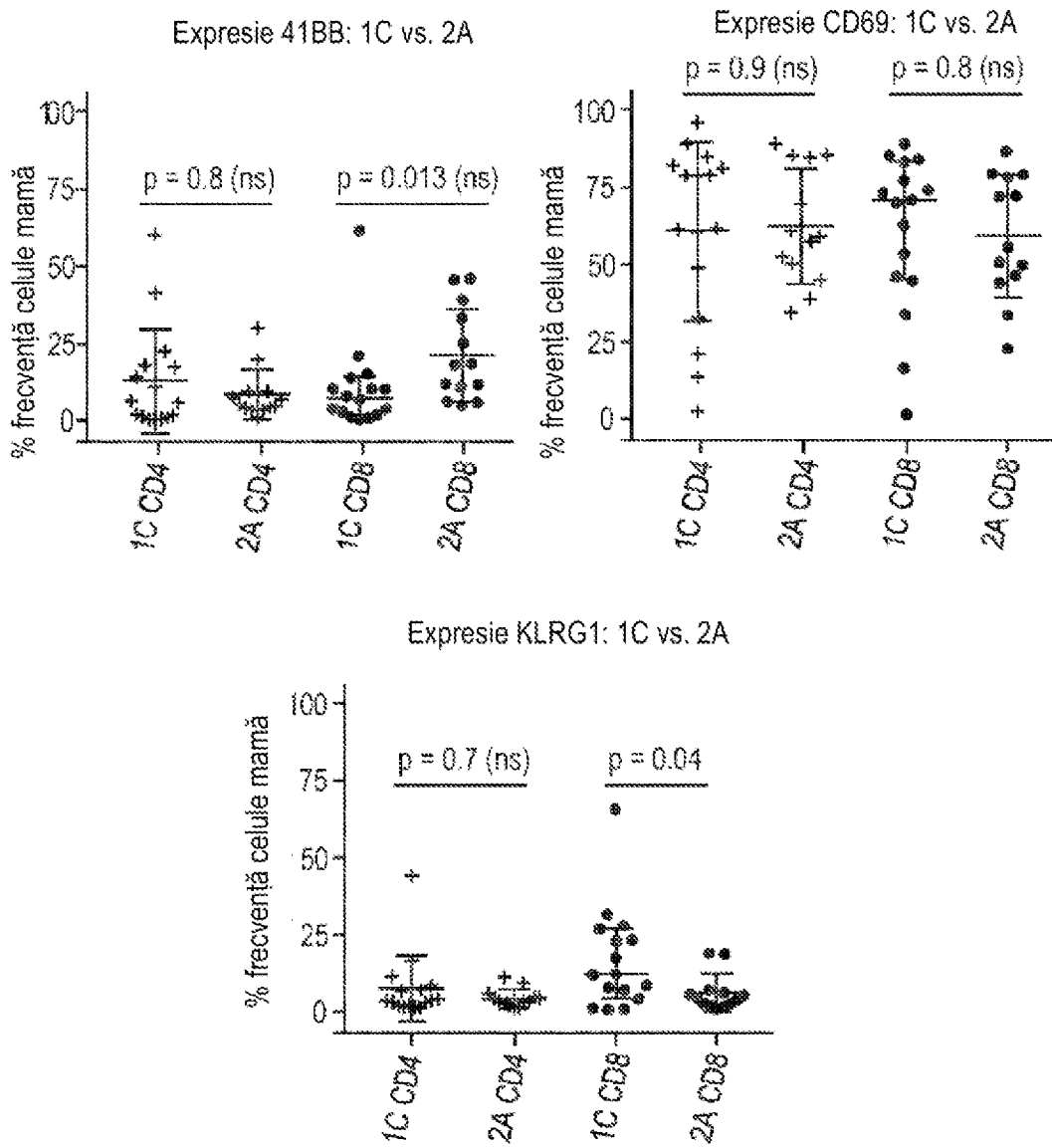


Figure 21

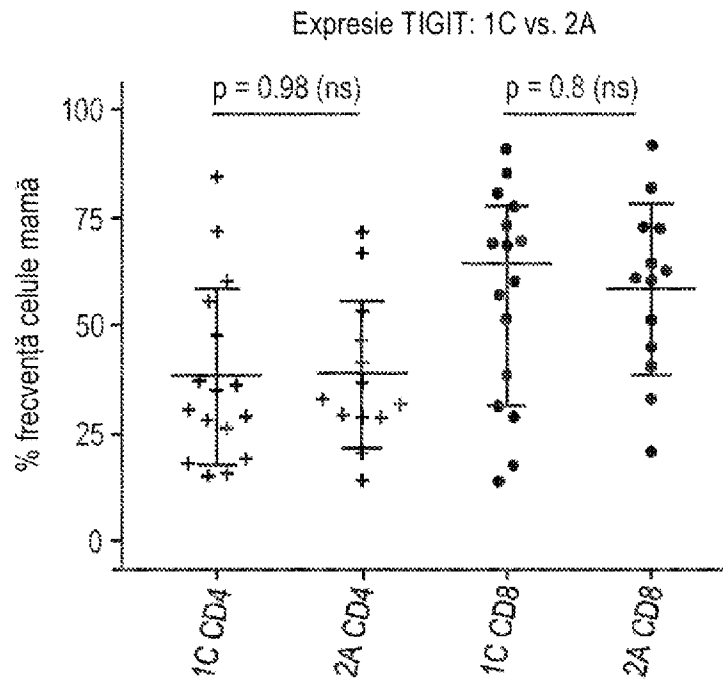


Figure 22

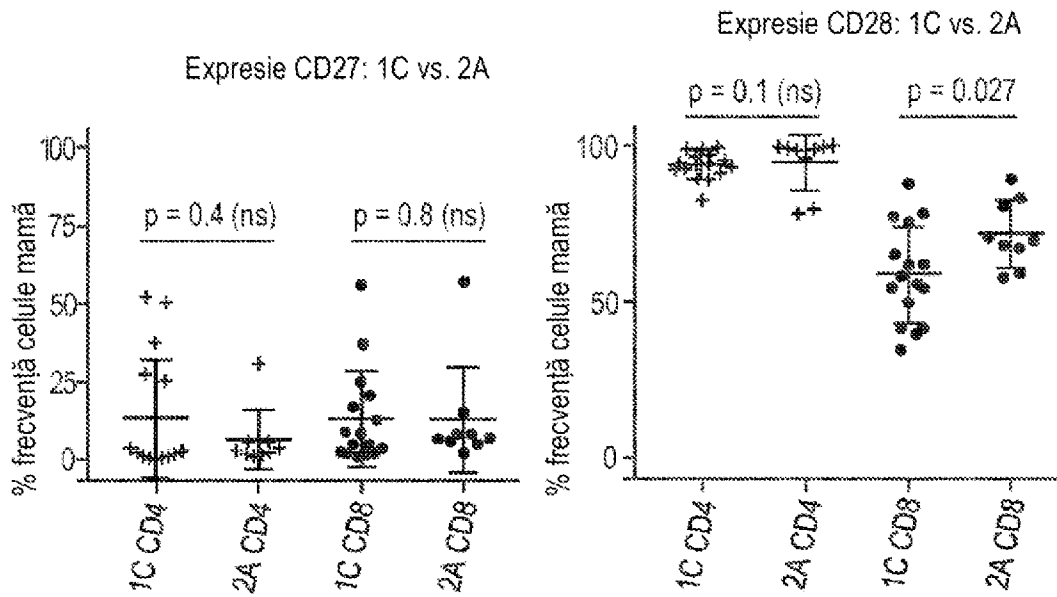


Figure 23

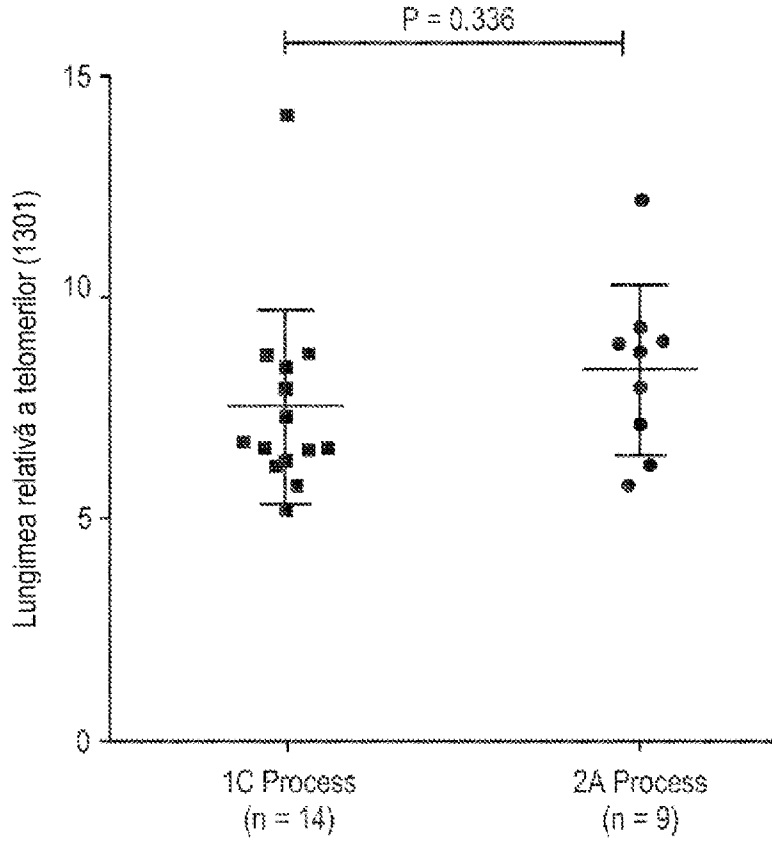


Figure 24

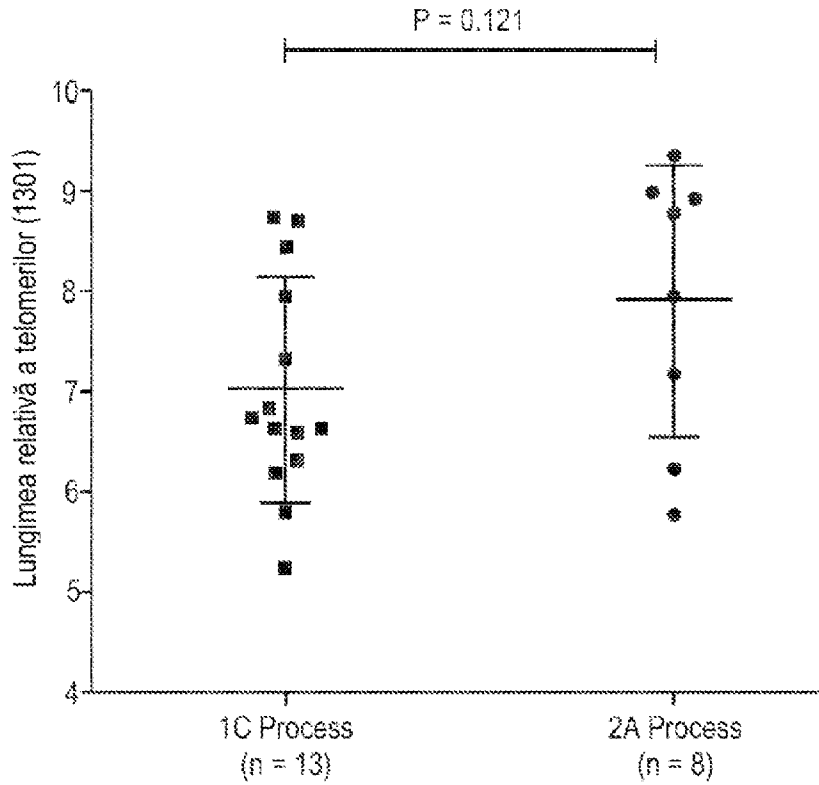


Figure 25

Figure 26

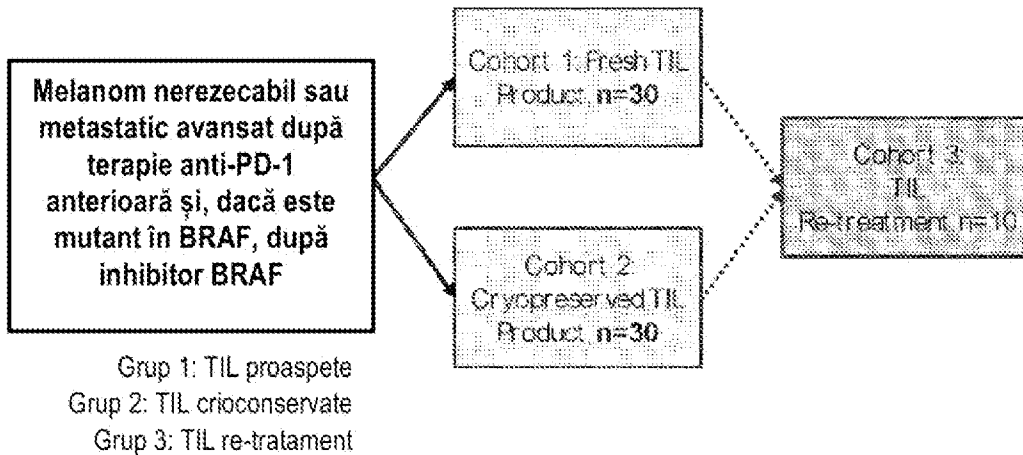


Figure 27

Proces 2A: circa 22 zile Etapele A-E

Process 2A: about 22 days from Steps A - E

Obținerea probei tumorale de la pacient	1. STEP A Obtain Patient Tumor Sample
Fragmentare și prima expansiune 3zile – 14 zile	2. STEP B Fragmentation and First Expansion 3 days to 14 days
Tranziție de la prima la a doua expansiune Fără depozitare și sistem închis	3. STEP C First Expansion to Second Expansion Transition No Storage and Closed System
A doua expansiune Celule feeder de prezentare a antigenului Sistem închis	4. STEP D Second Expansion IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells Closed System
Recoltare TIL din etapa D Sistem închis	5. STEP E Harvest TILs from Step D Closed System
Compoziție finală și/sau transfer în pungă de perfuzie (opțional crioconservare)	6. STEP F Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)

STEP = ETAPA

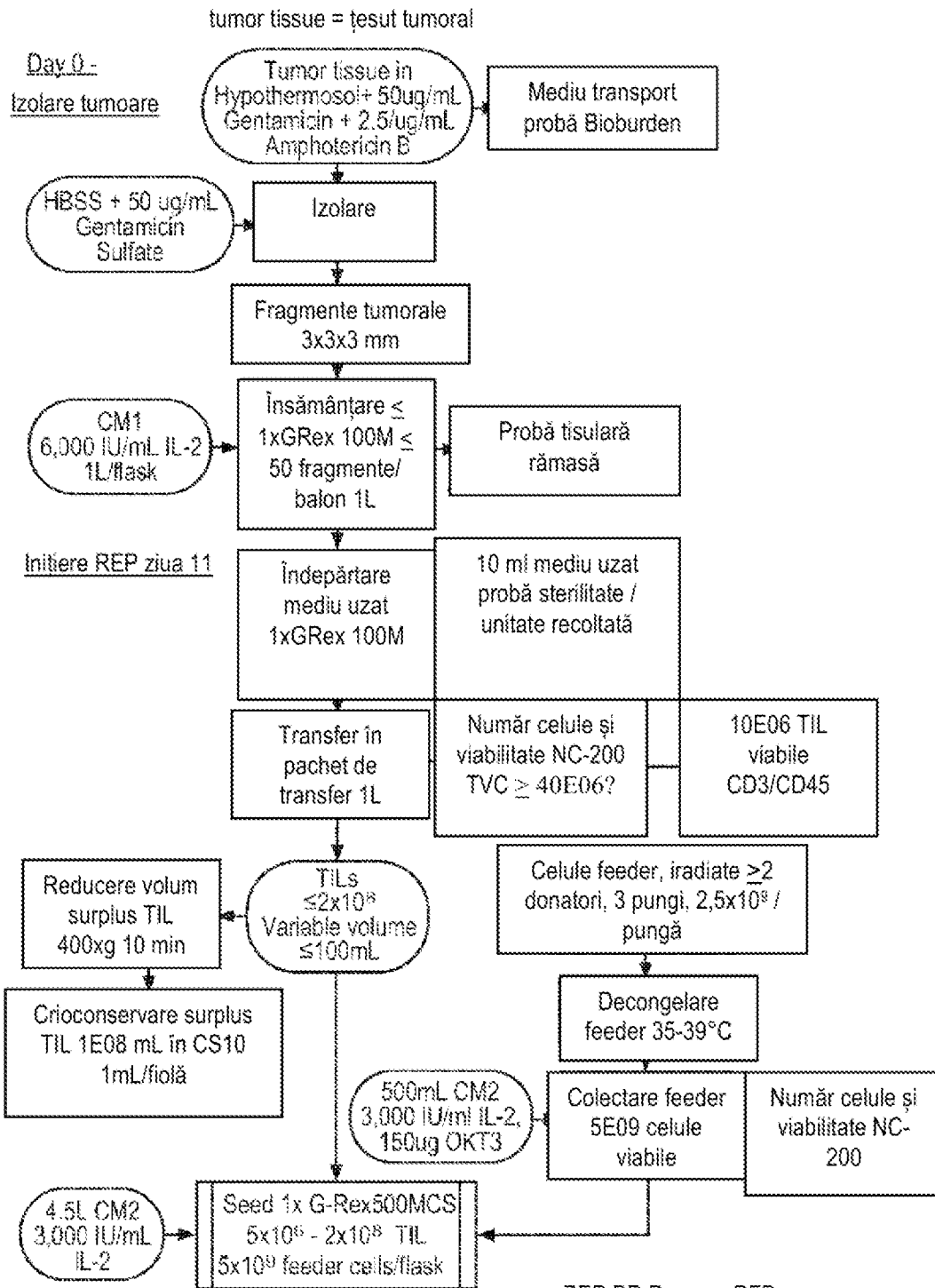
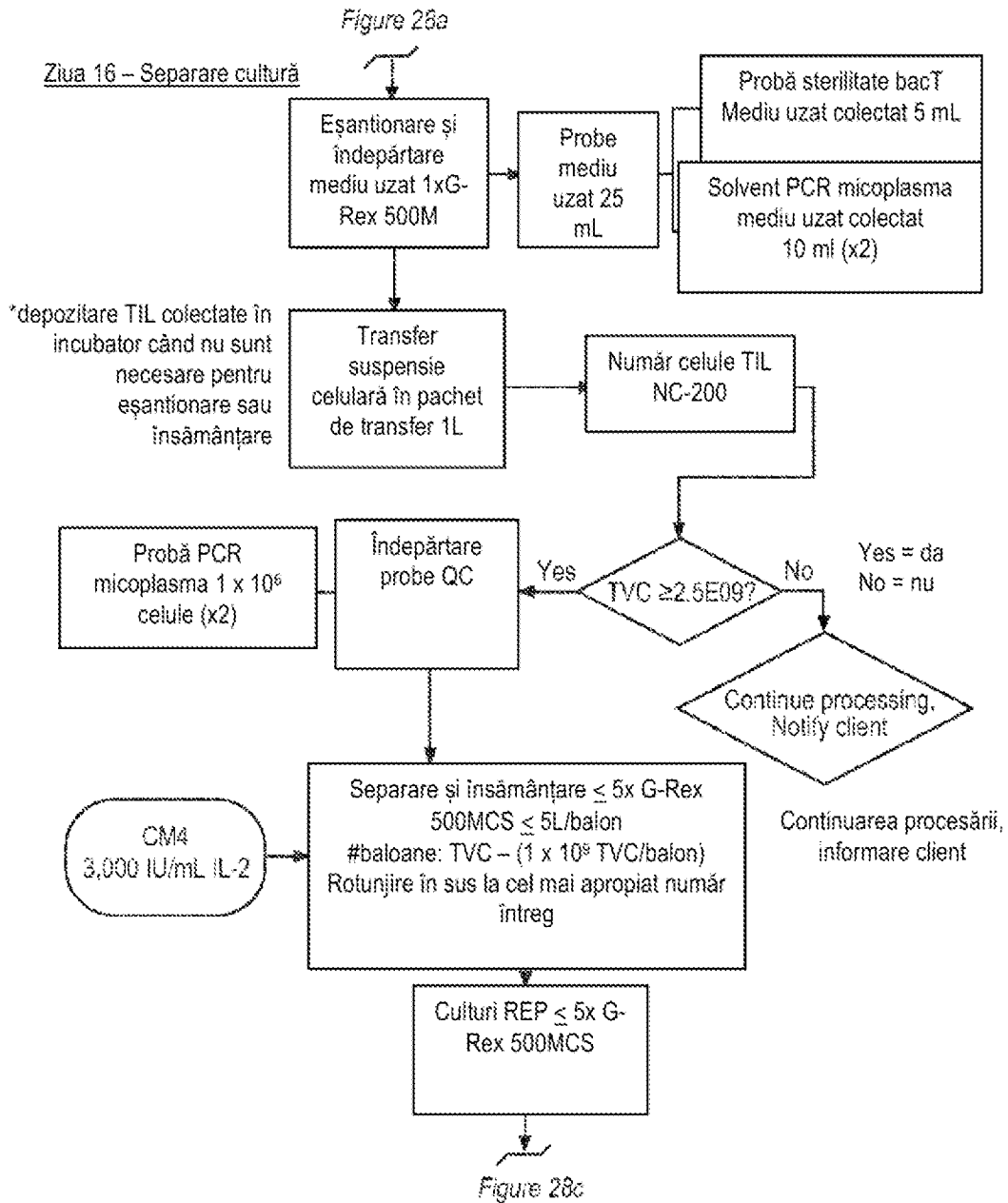
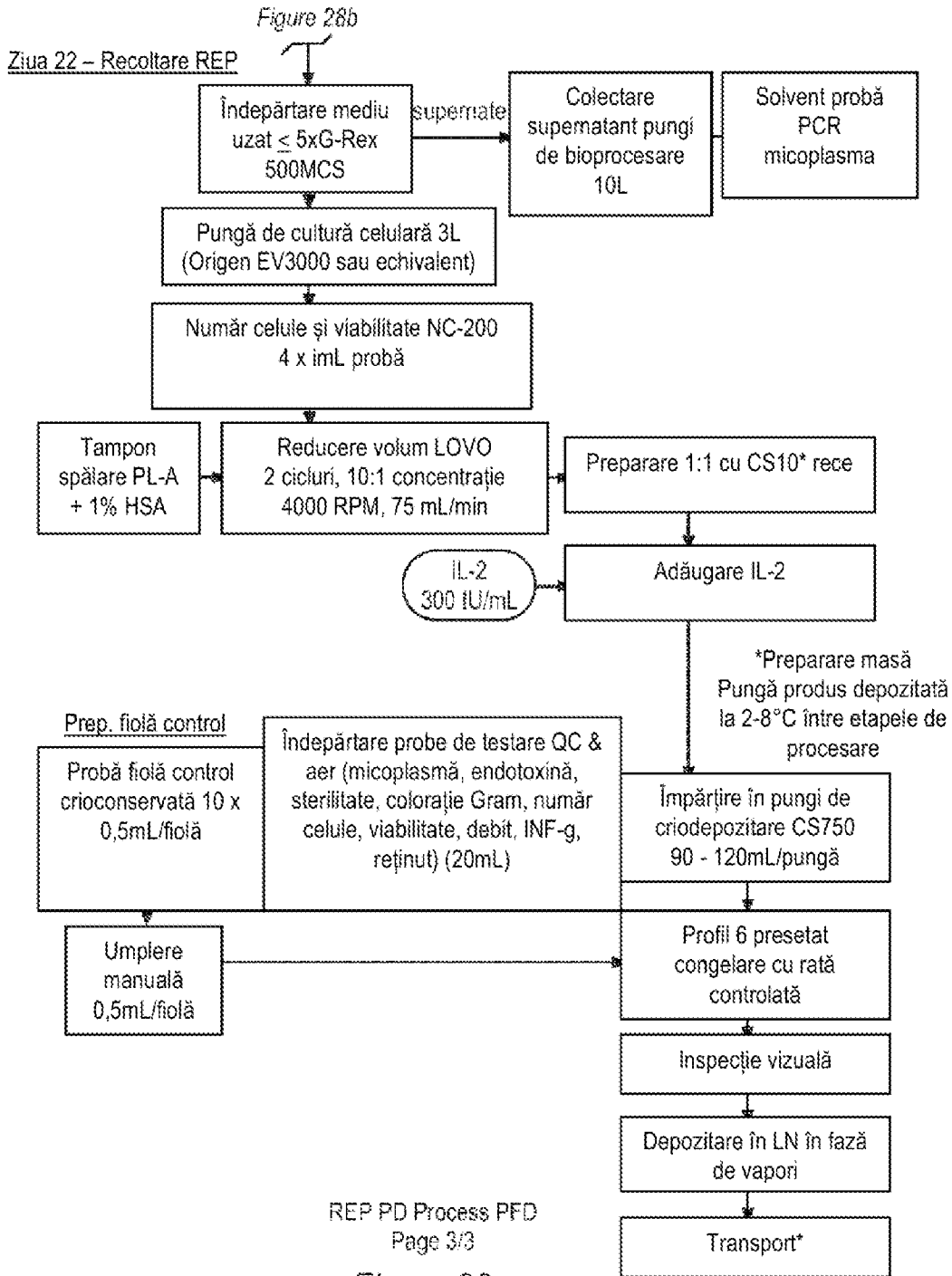


Figure 28b

REP PD Process PFD
Page 1/3
Figure 28a

Day = ziua
Flask = balon
Variable volume = volum variabil
Seed = însămânțare
Feeder cells = celule feeder





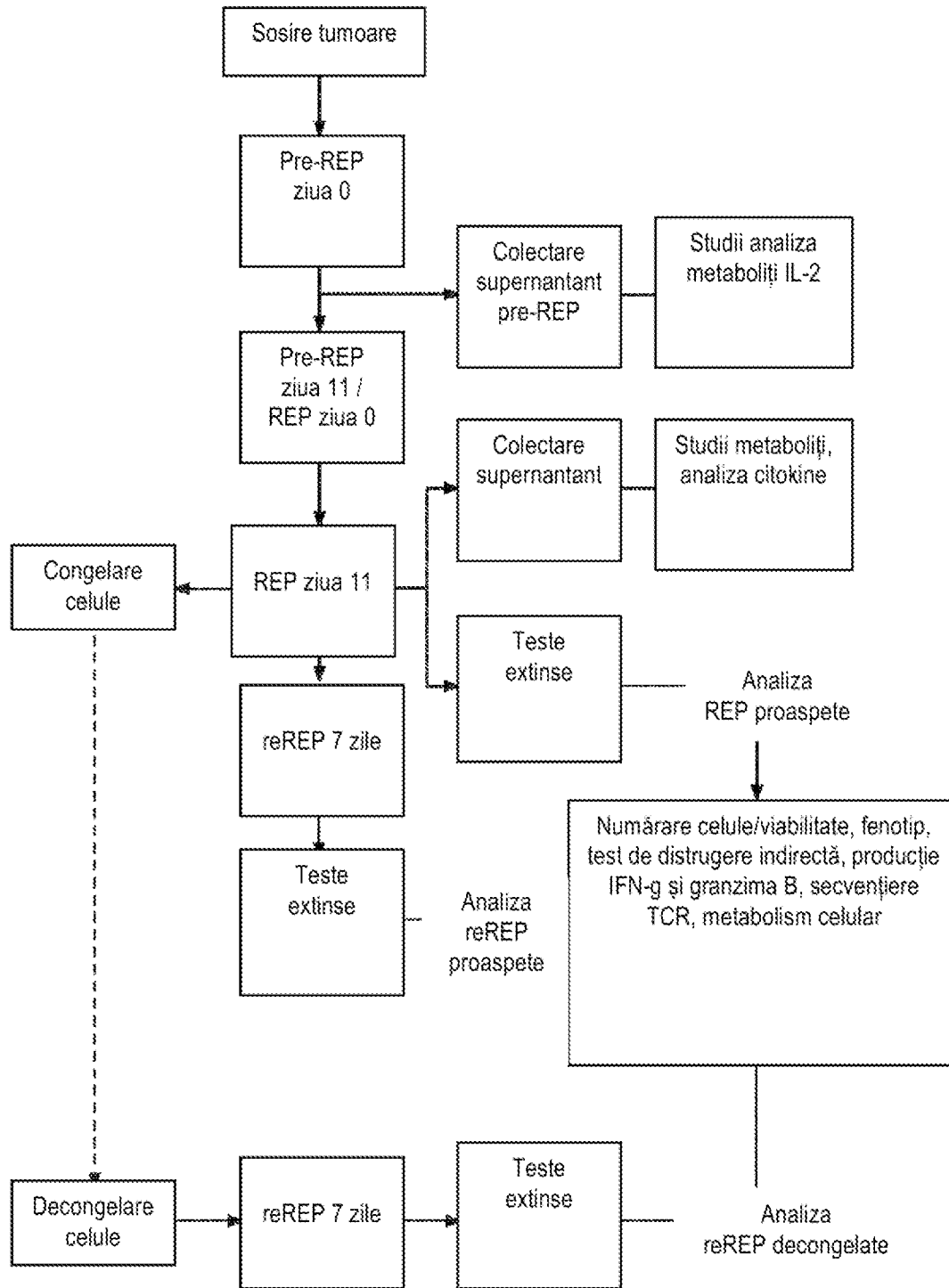


Figure 29

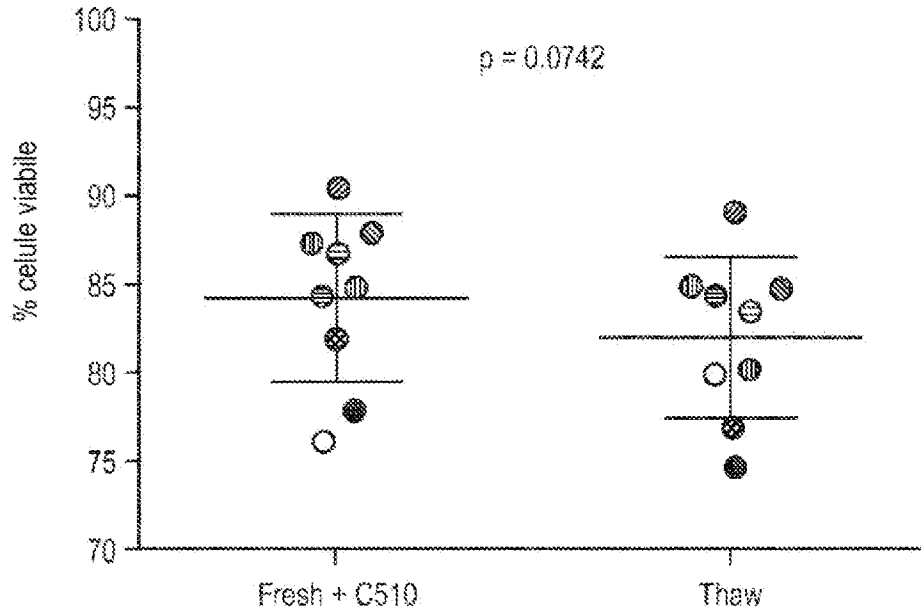
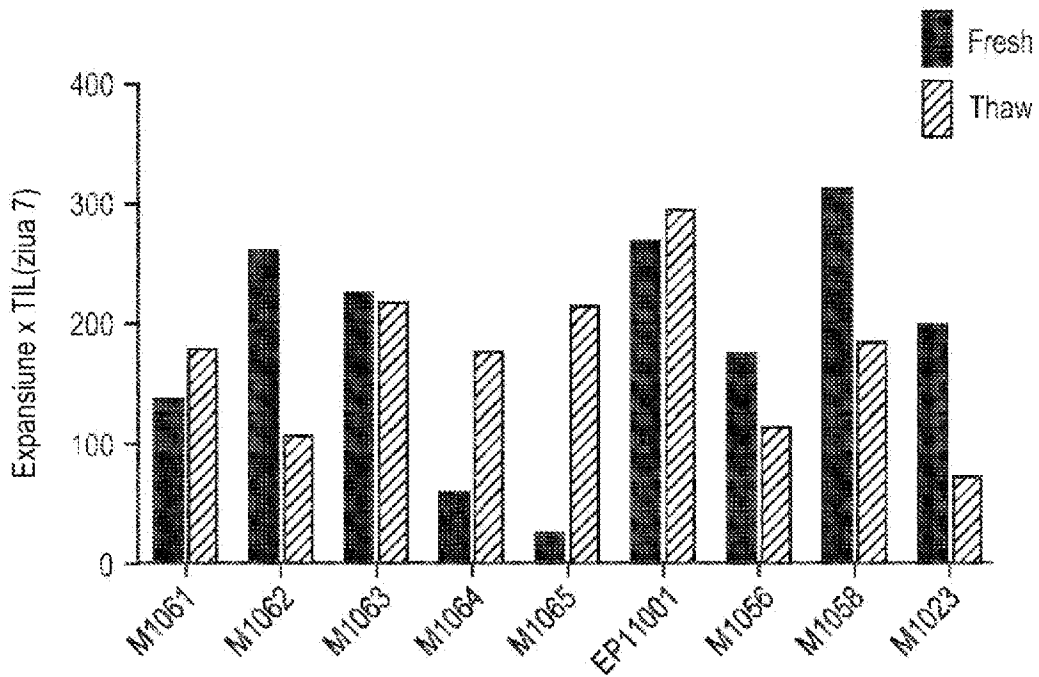


Figure 30

reREP – Expansiune x



Fresh = proaspete
Thaw = decongelate

Figure 31

Valori sanguine normale	
Glucoză	0.7-1g/l
Glutamină	0.3-0.65mmol/l
Sodiu	135-145mol/l
Potasiu	3.5-5.0mmol/l
Acid lactic	0.060-.16g/l
Amoniac	.023-.047mmol/l

Figure 32

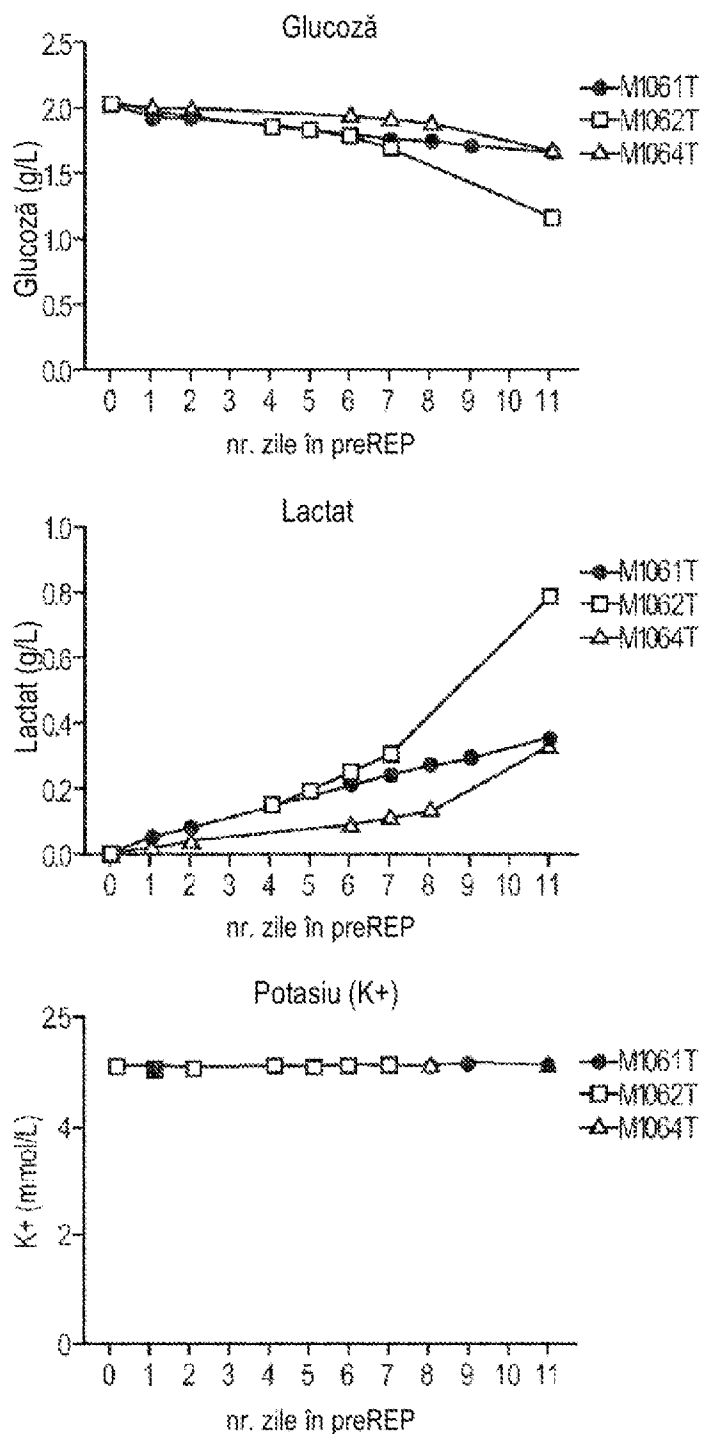


Figure 33a

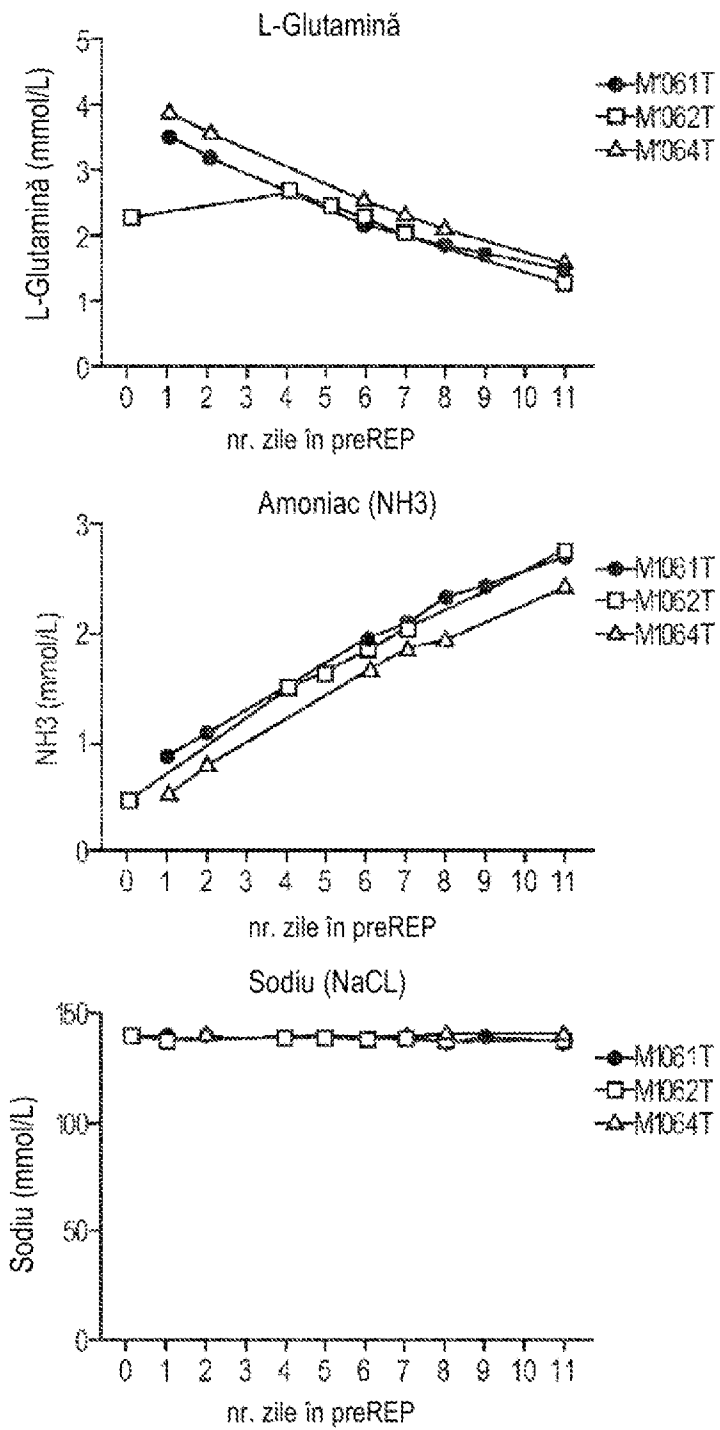


Figure 33b

IL-2

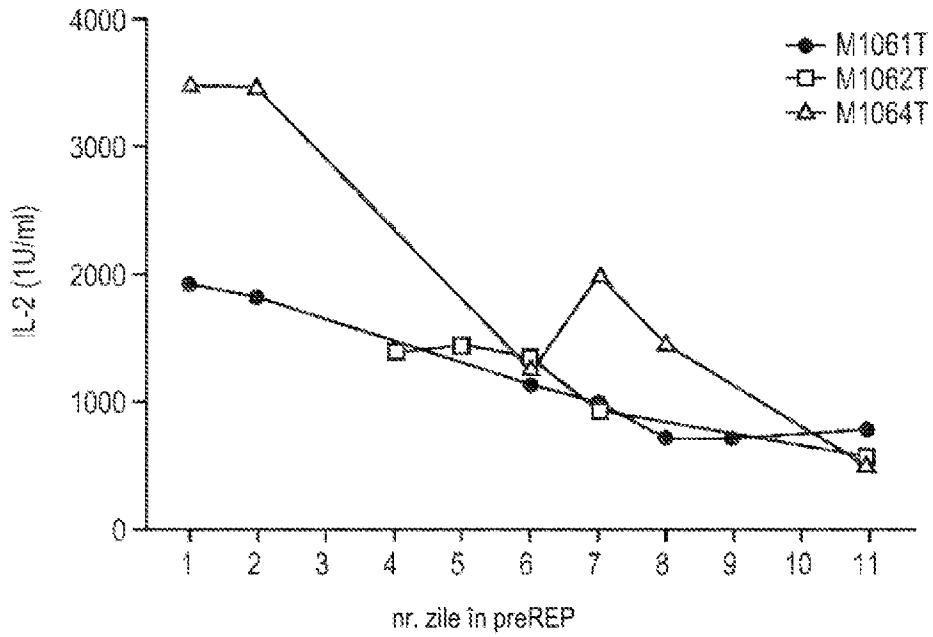


Figure 34

IFN- γ

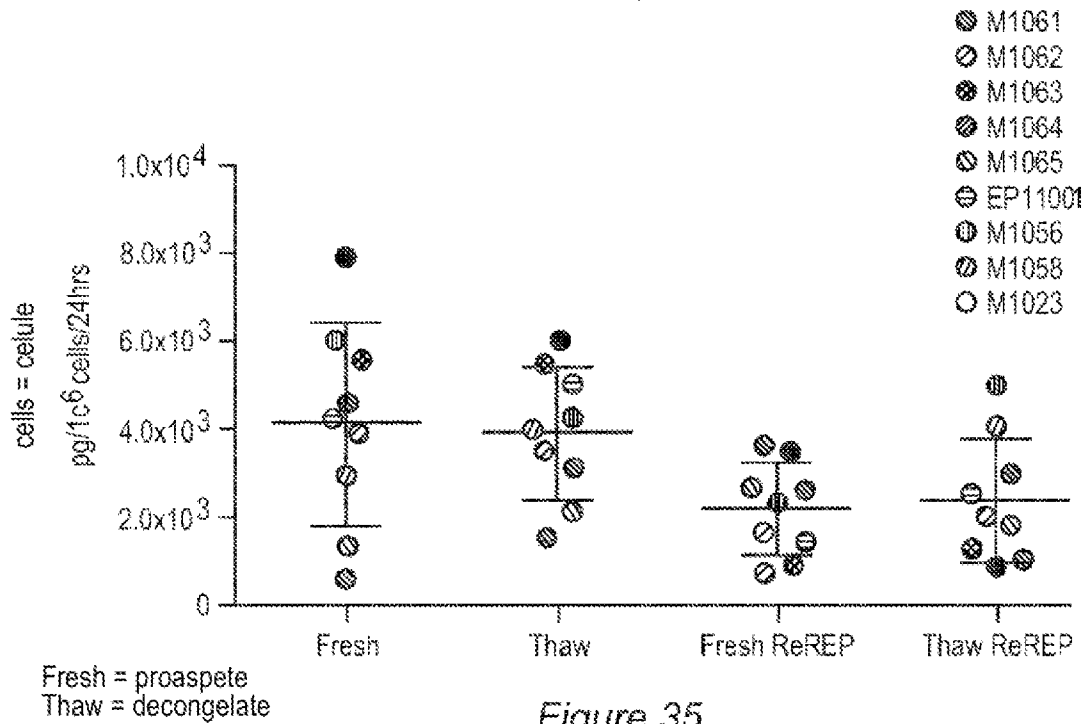
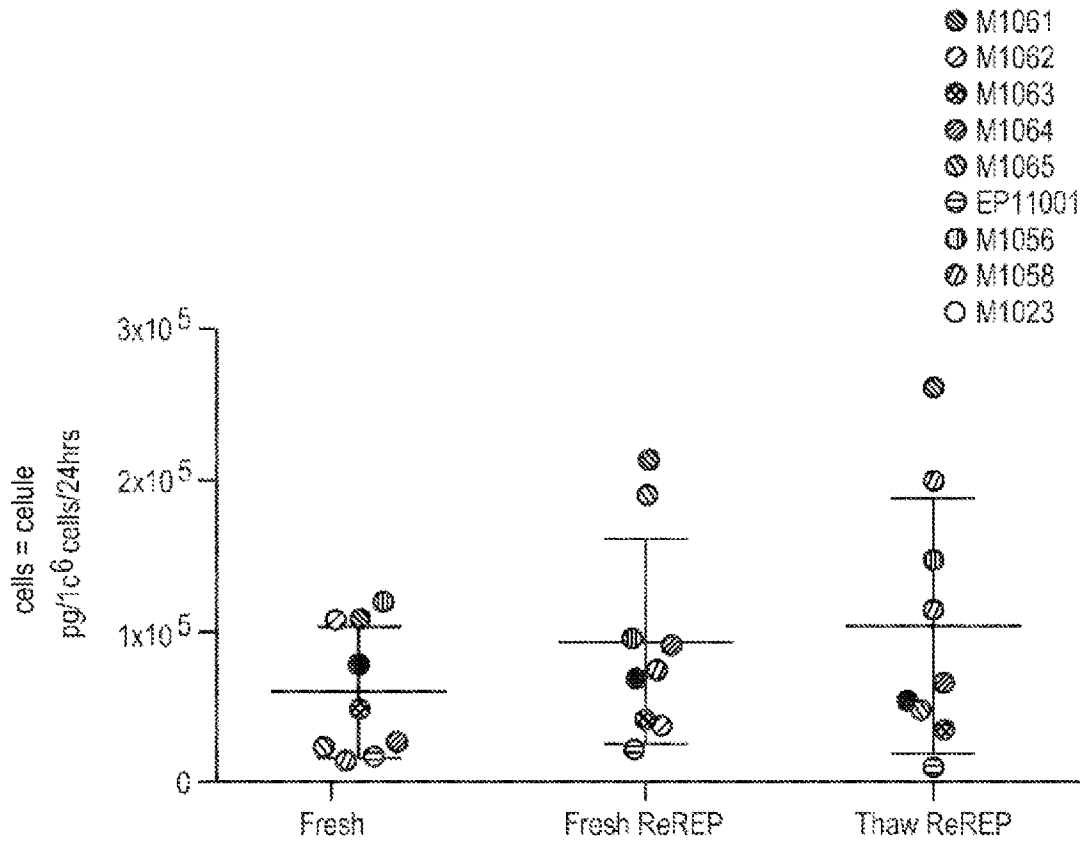


Figure 35

Granzima B

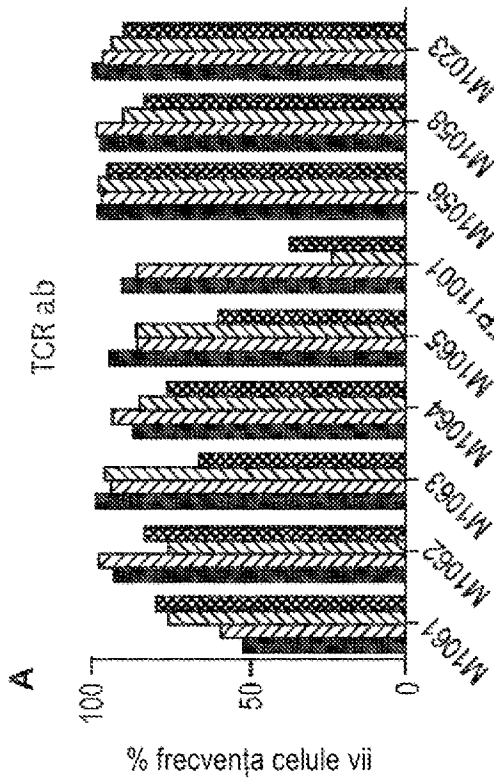


Fresh = proaspete
Thaw = decongelate

Figure 36

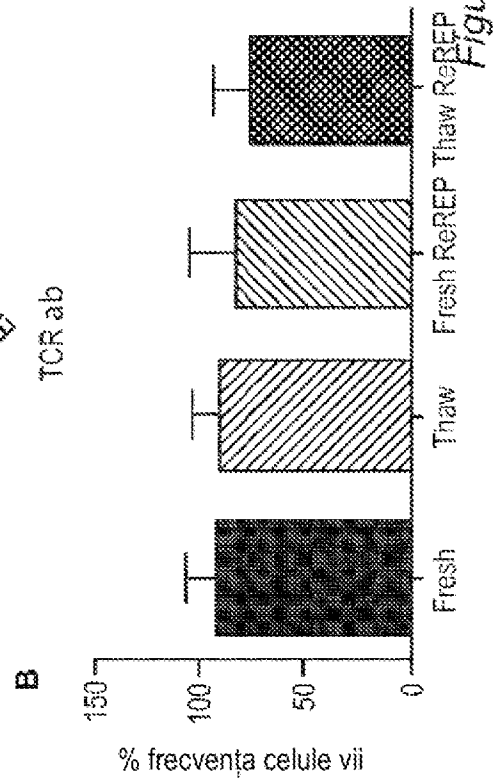
Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP



	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test		
P-value	0.9582	0.2375
Summary	ns	ns
Significant	No	No

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

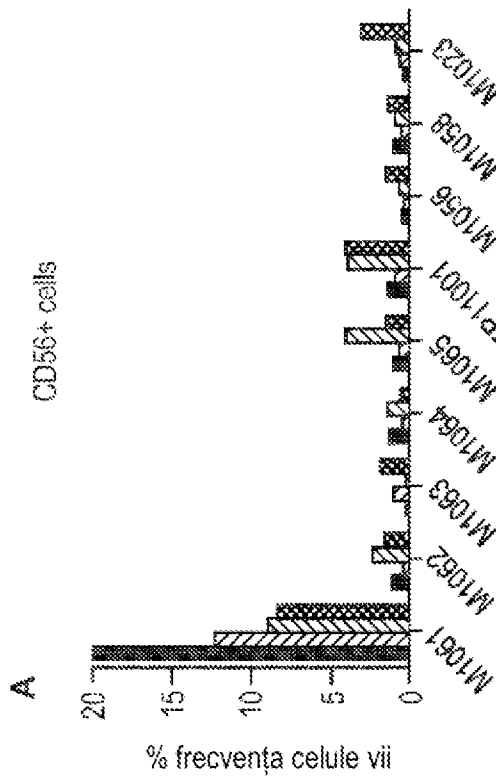


	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	89.80	89.70	80.68	74.58
SD	15.01	12.28	22.57	17.79
SEM	5.004	4.093	7.525	5.929

Figure 37

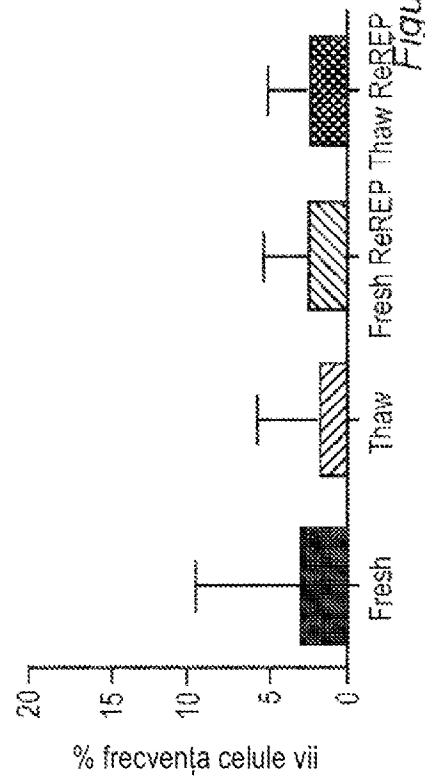
Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie

■ Fresh
 ▨ Thaw
 ▩ Fresh ReREP
 ▪ Thaw ReREP



T-Test	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
P-value	0.2739	0.8846
Summary	ns	ns
Significant	No	No

■ Fresh
 ▨ Thaw
 ▩ Fresh ReREP
 ▪ Thaw ReREP



	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	2.975	1.880	2.692	2.764
SD	6.589	3.843	2.774	2.350
SEM	2.196	1.281	0.9245	0.7832

Figure 38

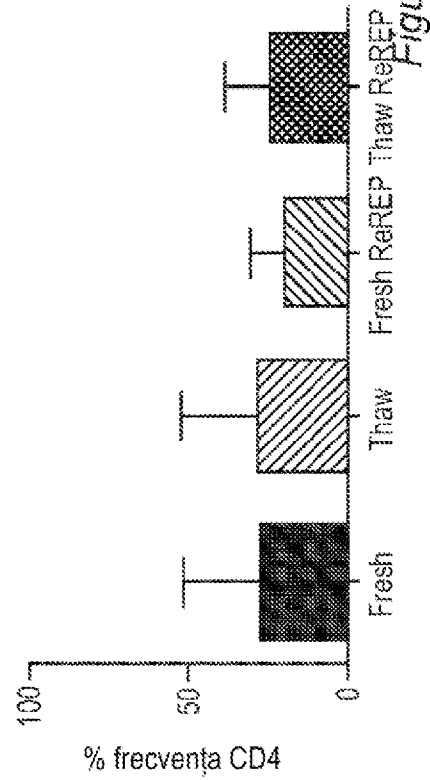
Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP



	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test		
P-value	0.5218	0.0110
Summary	ns	*
Significant	No	No

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

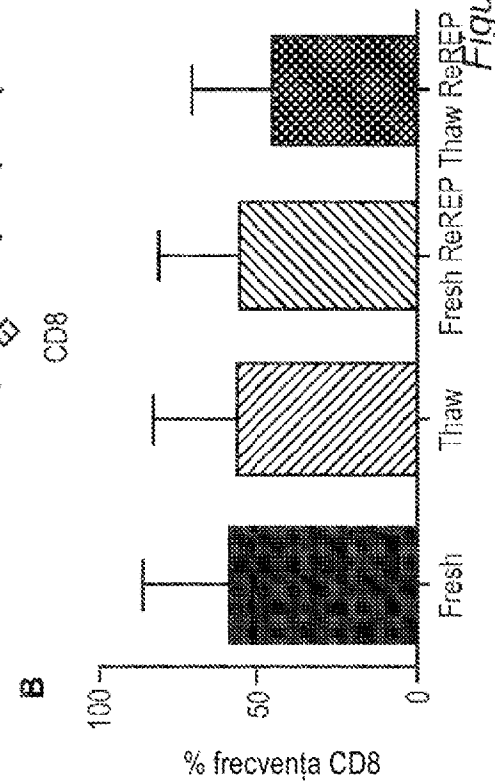
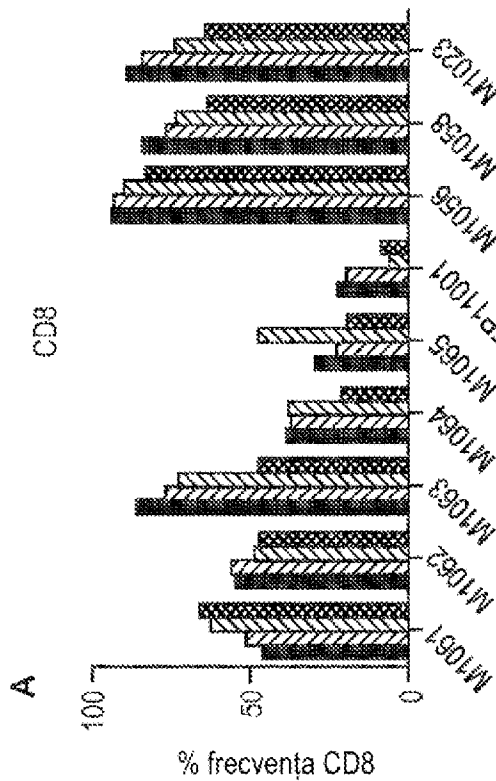


	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	27.28	28.08	19.42	24.49
SD	24.92	24.28	10.84	13.63
SEM	8.308	8.094	3.612	4.542

Figure 39

Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoare p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP



	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test		
P-value	0.0952	0.0264
Summary	ns	*
Significant	No	Yes

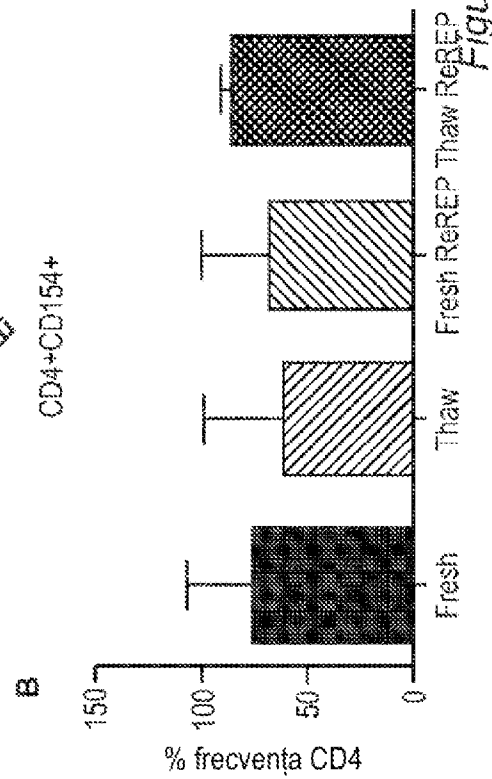
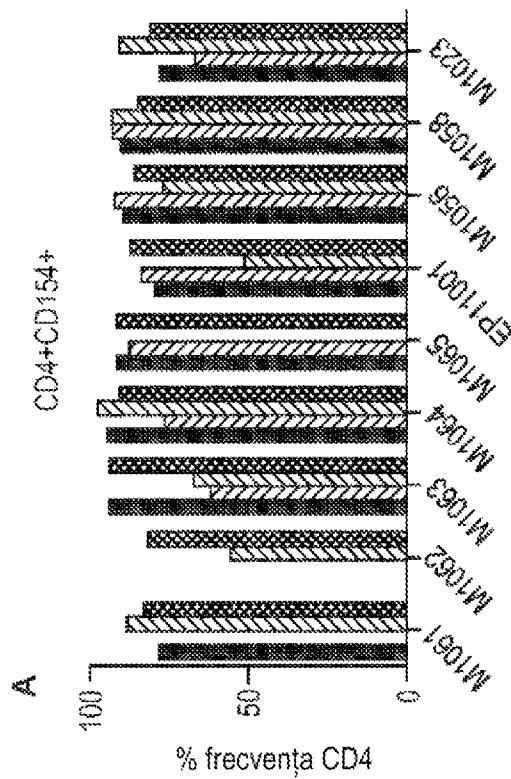
Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	60.13	57.13	57.16	46.75
SD	28.04	27.06	25.32	25.2
SEM	9.348	9.021	8.441	6.401

Figure 40

Fresh = proaspate
 Thaw = decongelate
 P-value = valoare p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP



	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test	0.1337	0.1416
P-value	ns	ns
Summary	No	No
Significant	No	No

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	77.03	62.23	69.18	36.83
SD	29.6	36.79	30.6	4.255
SEM	9.867	12.26	10.2	1.418

Figure 41

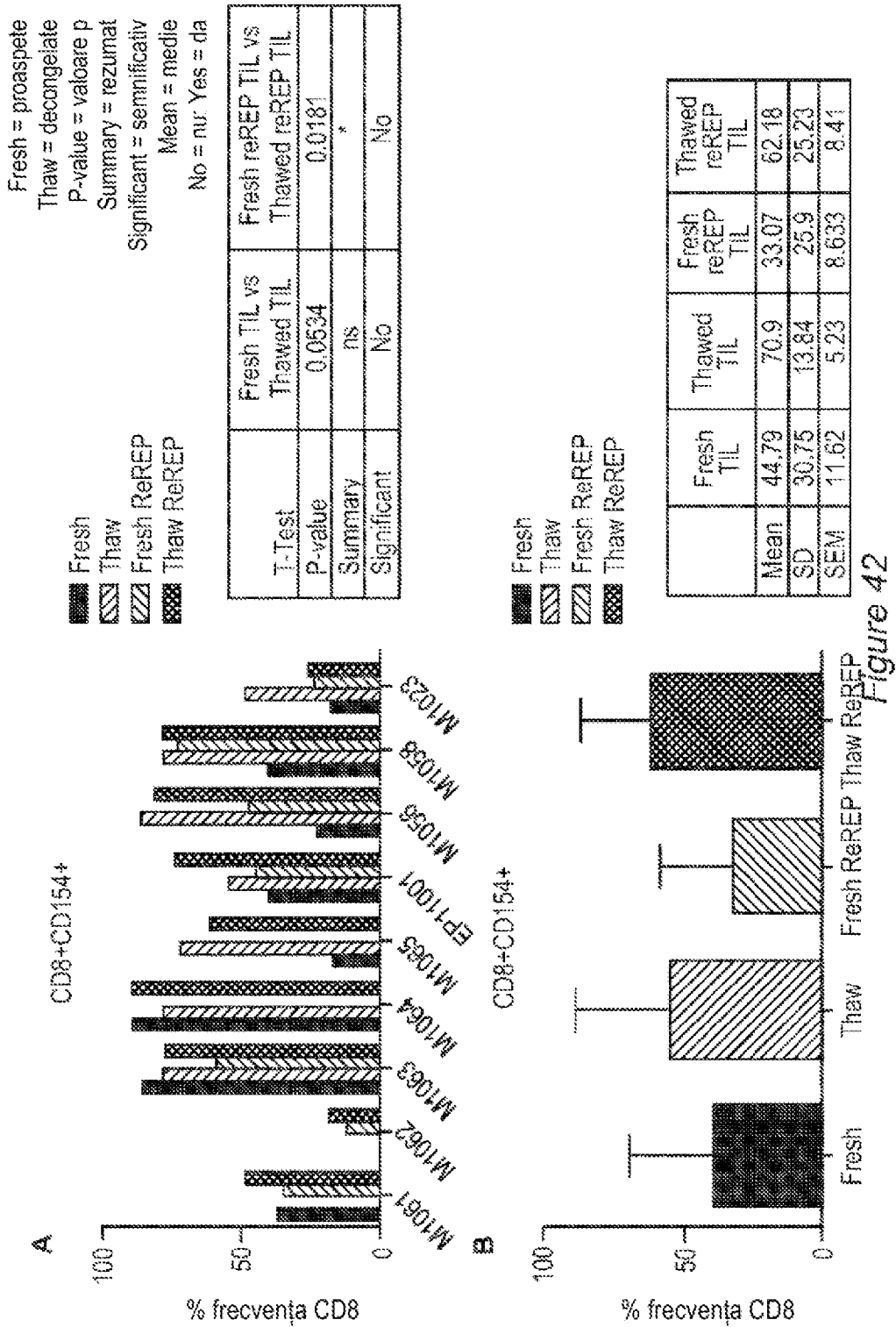
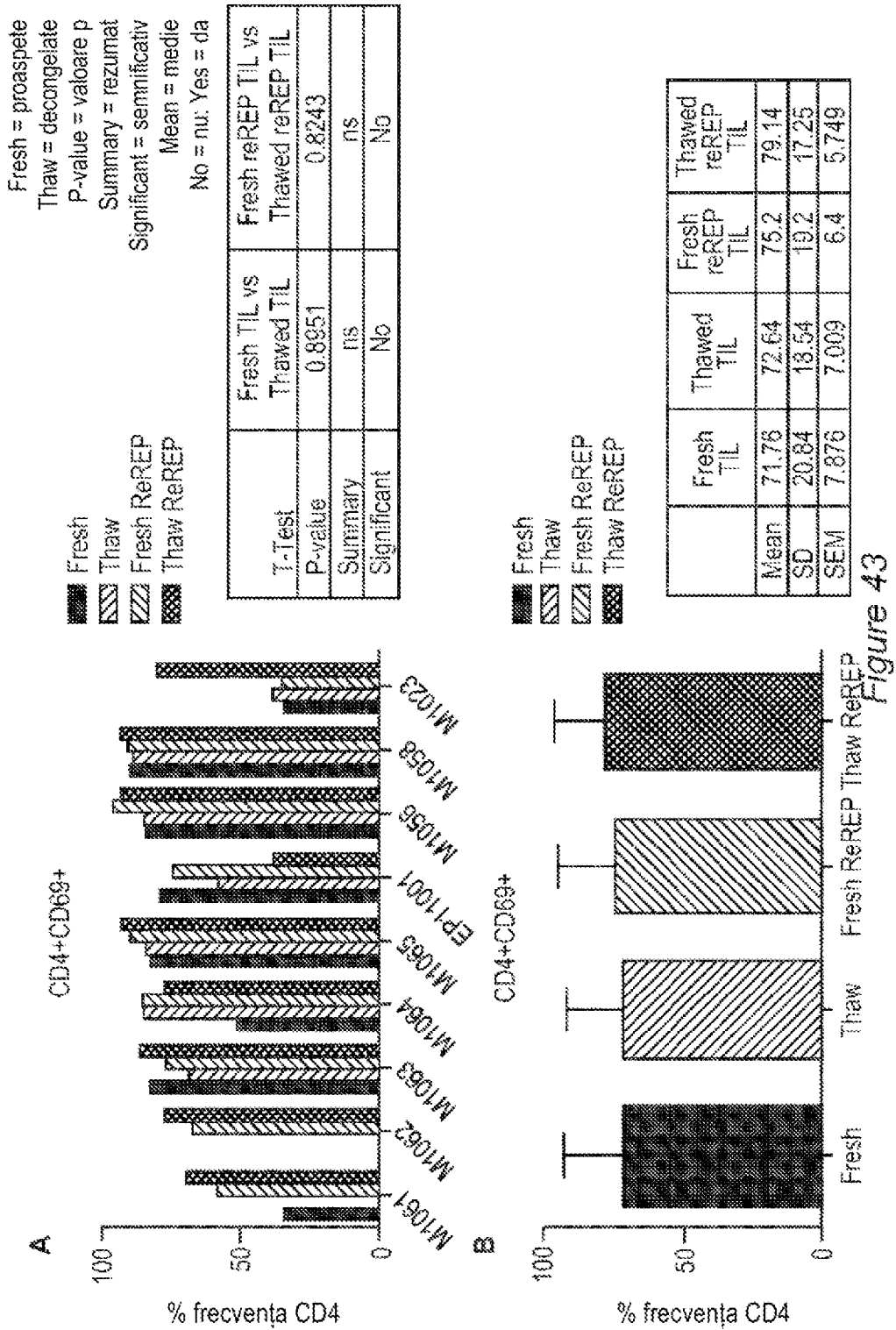


Figure 42



Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoare p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

T-Test	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
P-value	0.6788	0.7638
Summary	ns	ns
Significant	No	No

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	56.8	55.14	84.66	83.19
SD	29.12	33.48	11.1	13.15
SEM	9.707	11.16	3.699	4.383

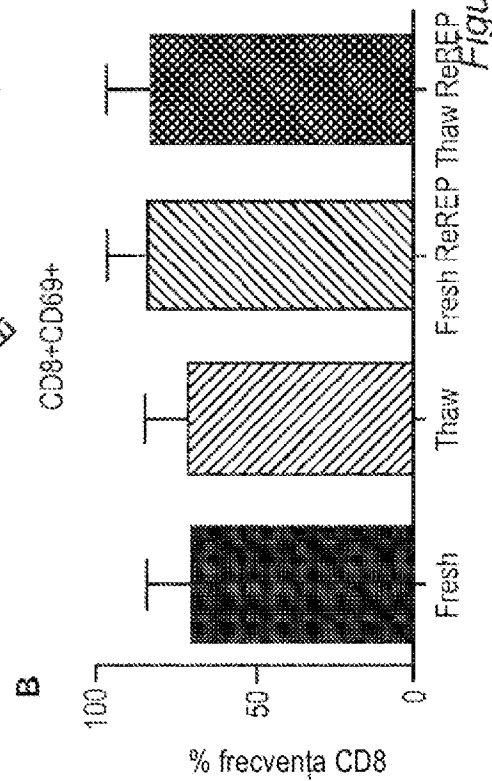
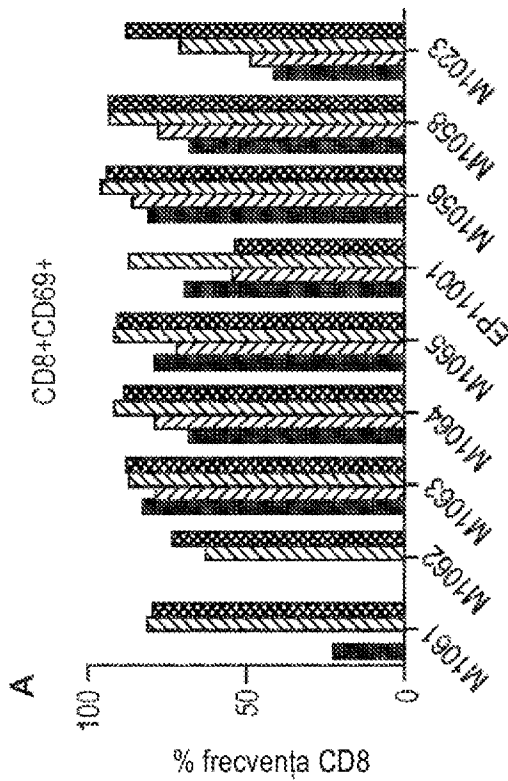
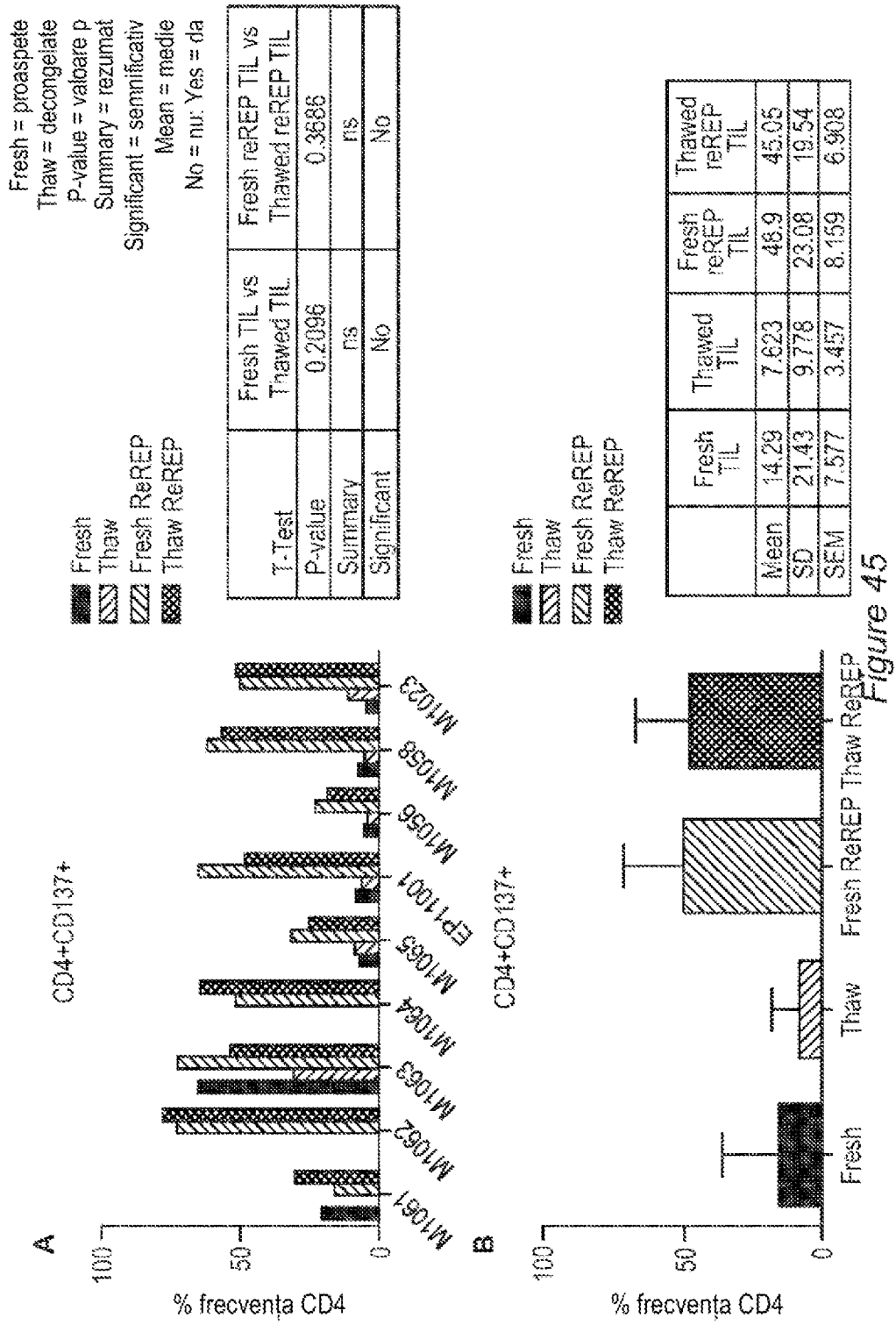
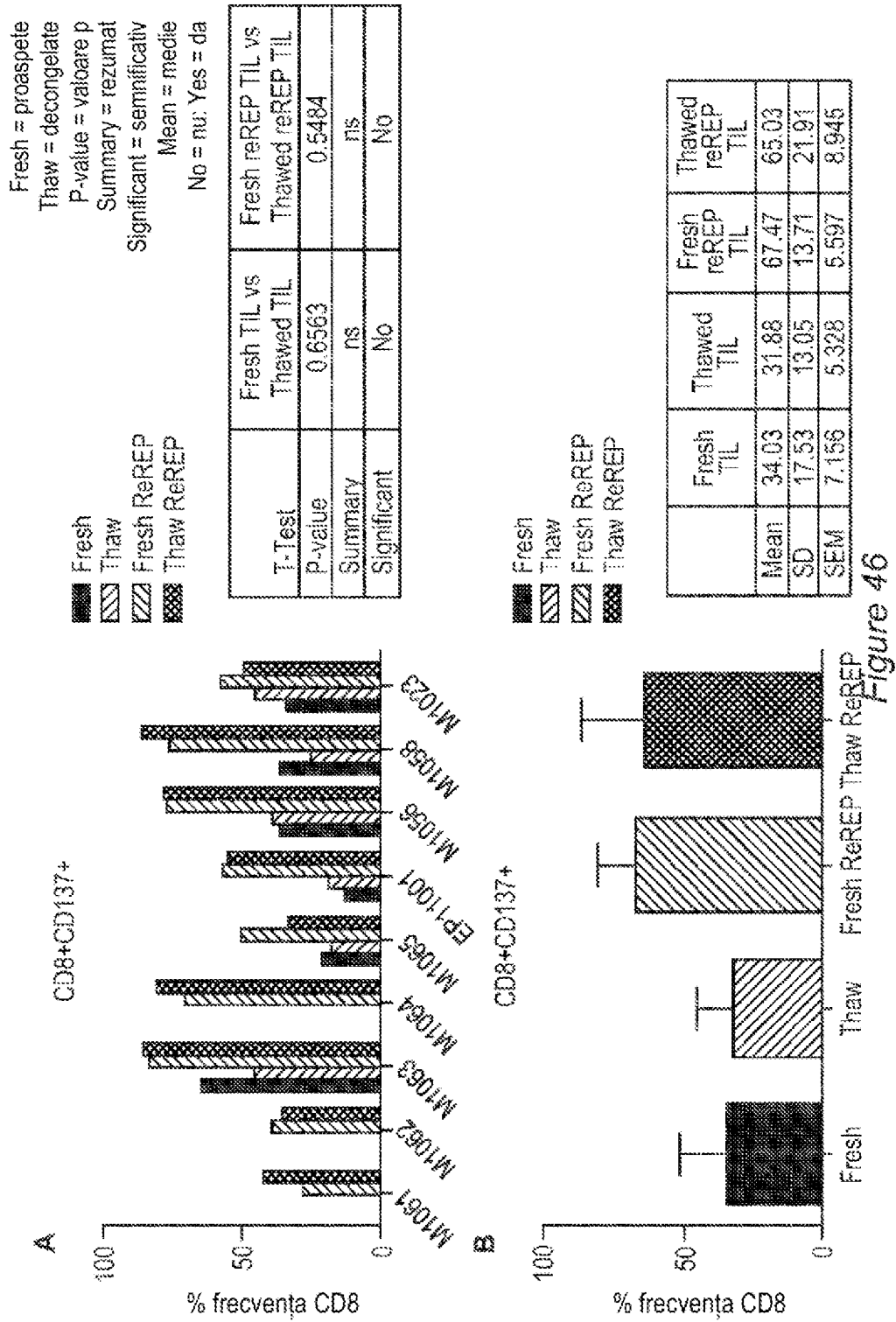


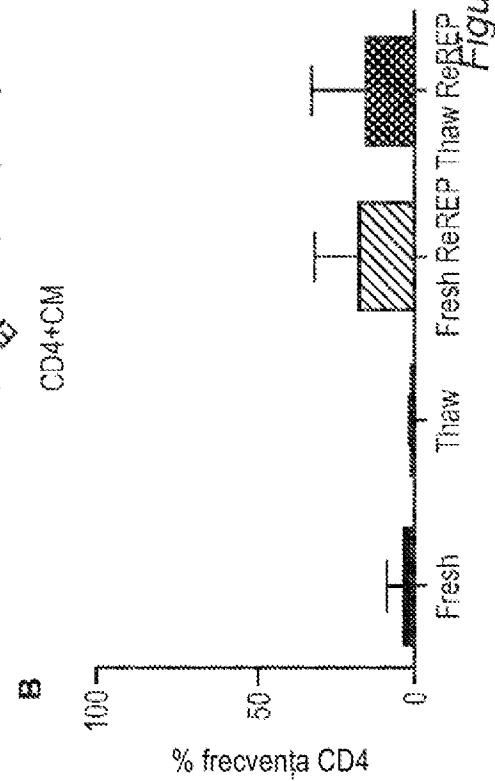
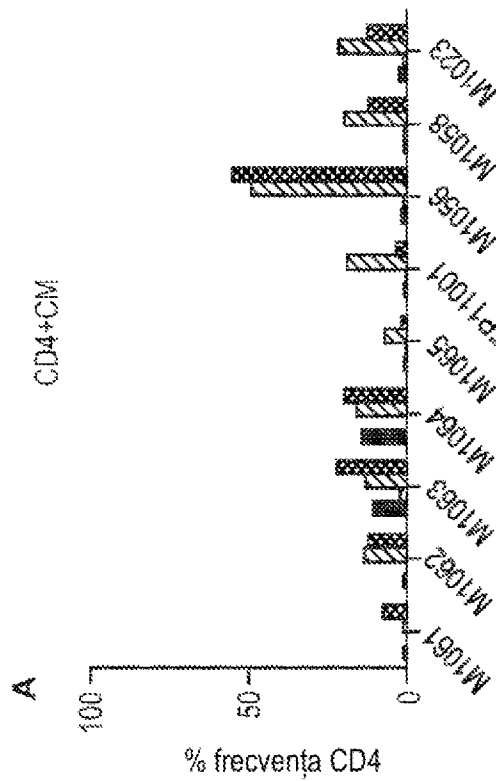
Figure 44





Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoare p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP



	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test		
P-value	0.1658	0.5535
Summary	ns	ns
Significant	No	No

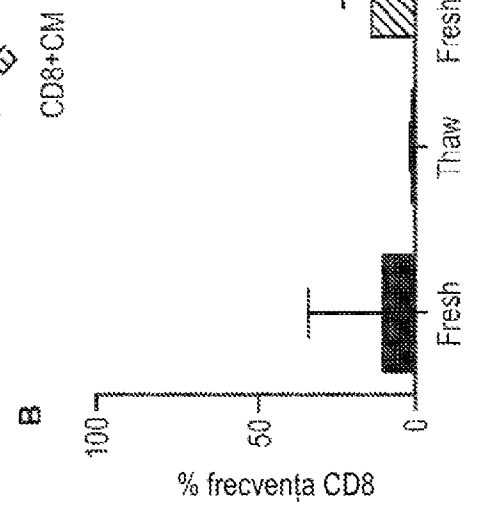
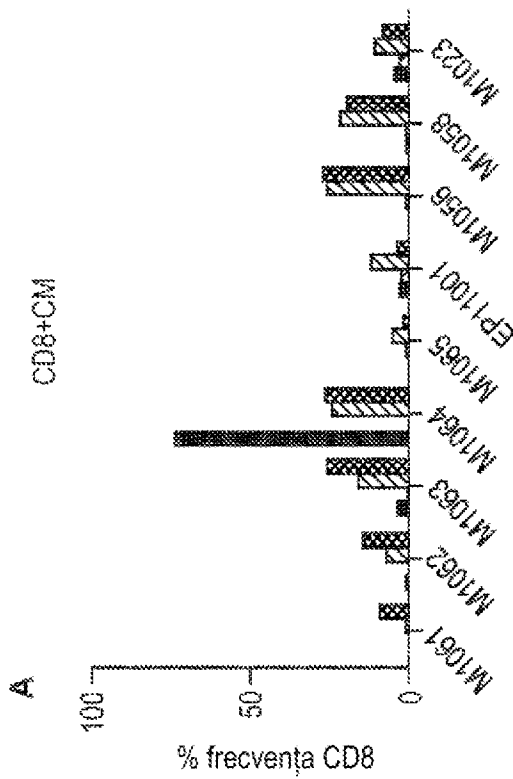
Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	3.668	1.043	18.13	16.46
SD	5.094	0.8127	13.37	16.02
SEM	1.698	0.2709	4.456	5.341

Figure 47

Fresh = proaspete
 Thaw = decongeleate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

■ Fresh
 ▨ Thaw
 ▩ Fresh ReREP
 ▪ Thaw ReREP



T-Test	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
P-value	0.3086	0.5768
Summary	ns	ns
Significant	No	No

■ Fresh
 ▨ Thaw
 ▩ Fresh ReREP
 ▪ Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	9.529	0.7811	13.69	14.87
SD	23.92	0.7532	8.678	9.912
SEM	7.972	0.2511	2.893	3.304

Figure 48

Fresh = proaspete
 Thaw = decongeleat
 P-value = valoare p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu. Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test		
P-value	0.5539	0.8411
Summary	ns	ns
Significant	No	No

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	93.61	87.04	77.13	77.92
SD	6.055	32.67	17.25	21.38
SEM	2.018	10.89	5.751	7.127

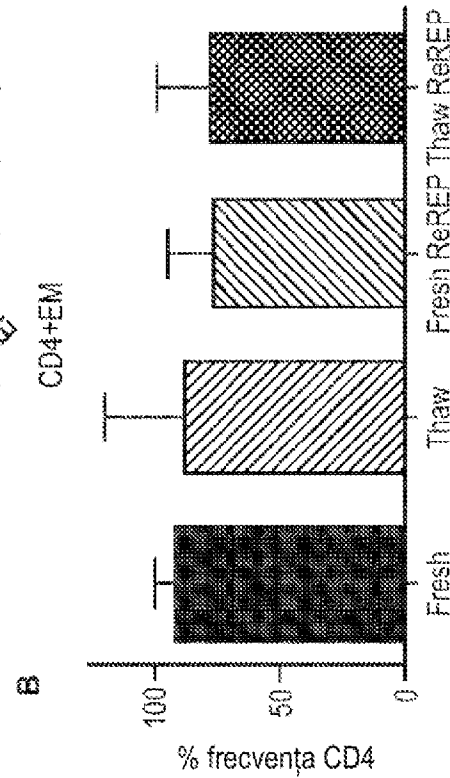
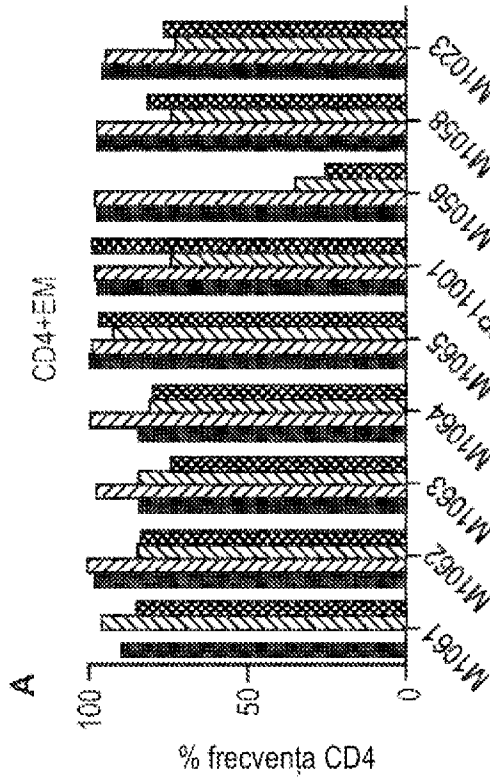


Figure 49

Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test		
P-value	0.9546	0.4107
Summary	ns	ns
Significant	No	No

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	84.94	85.77	83.77	81.93
SD	24.74	32.36	8.17	8.75
SEM	8.246	10.79	2.723	2.917

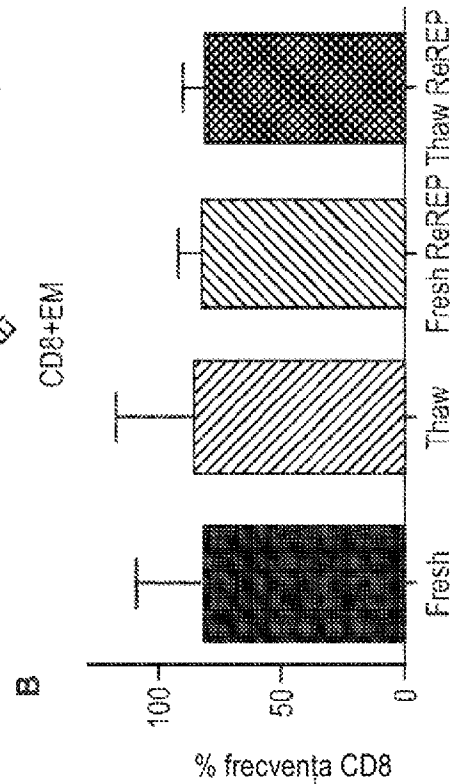
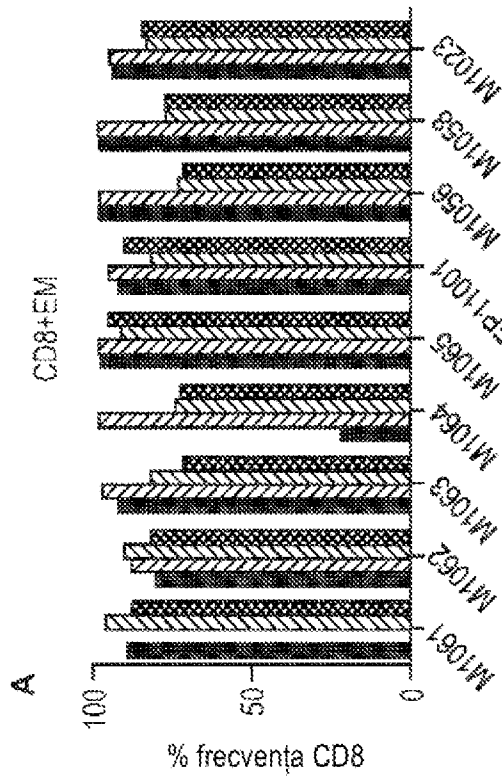
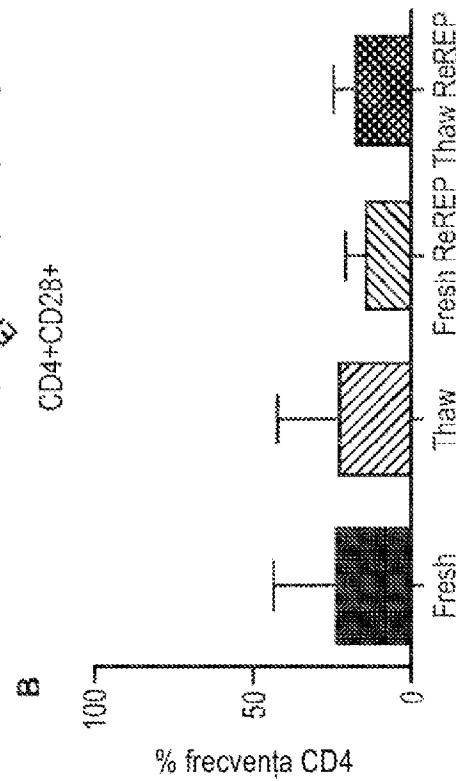
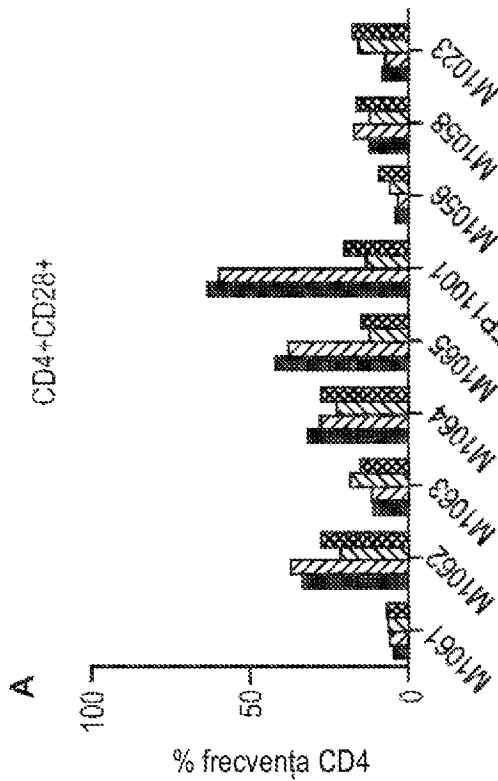


Figure 50

Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP



T-Test	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
P-value	0.8745	0.0205
Summary	ns	*
Significant	No	Yes

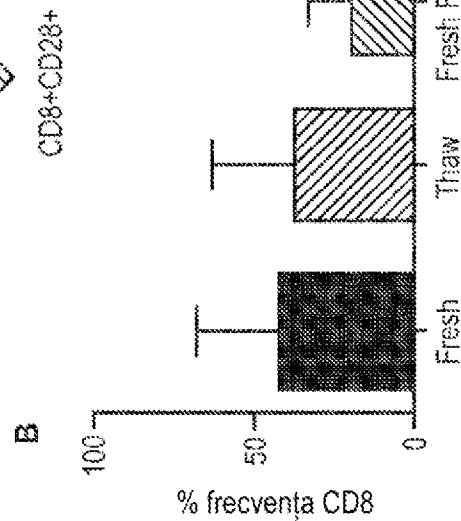
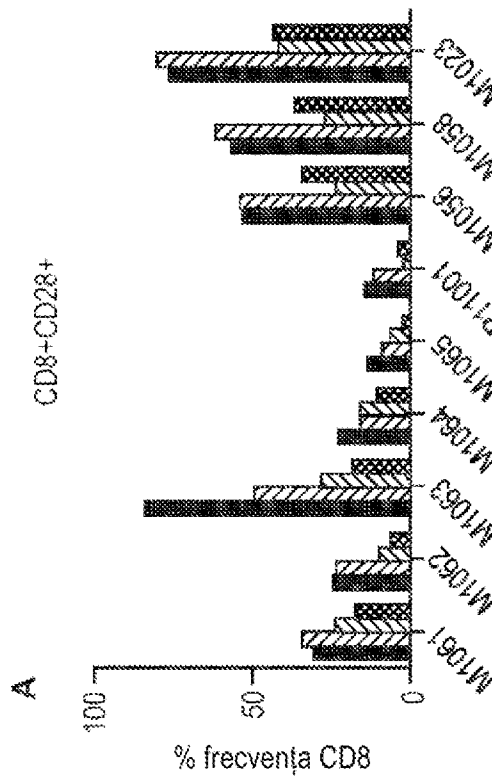
Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	23.28	23.1	14.39	17.39
SD	20.43	19.02	5.215	7.078
SEM	0.81	0.341	1.372	2.359

Figure 51

Fresh = proaspete
 Thaw = decongeleate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

■ Fresh
 ▨ Thaw
 ▩ Fresh ReREP
 ▪ Thaw ReREP



	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test	0.3668	0.794
P-value	ns	ns
Summary	No	No
Significant	No	No

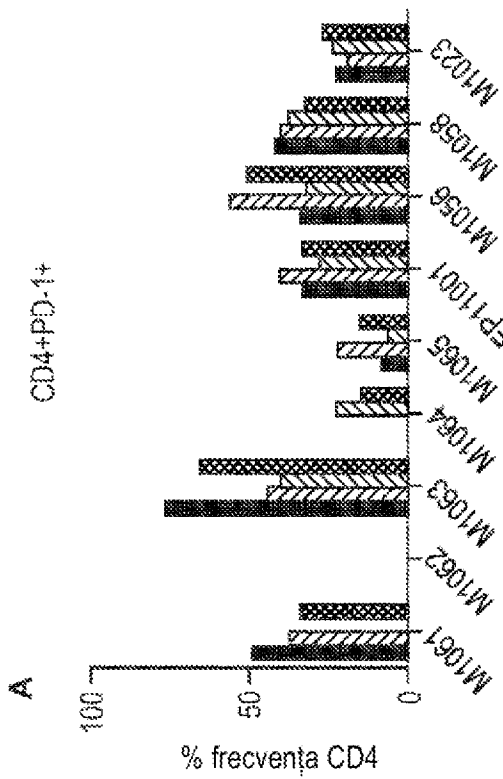
■ Fresh
 ▨ Thaw
 ▩ Fresh ReREP
 ▪ Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	41.68	37.75	20.1	19.45
SD	26.61	25.24	12.53	15.39
SEM	8.871	8.415	4.176	5.13

Figure 52

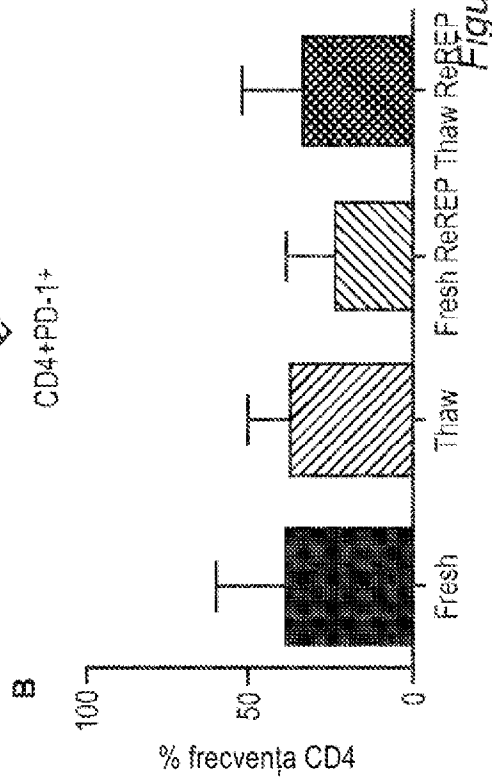
Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

■ Fresh
 ▨ Thaw
 ▩ Fresh ReREP
 ▪ Thaw ReREP



	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test		
P-value	0.9089	0.0912
Summary	ns	ns
Significant	No	No

■ Fresh
 ▨ Thaw
 ▩ Fresh ReREP
 ▪ Thaw ReREP

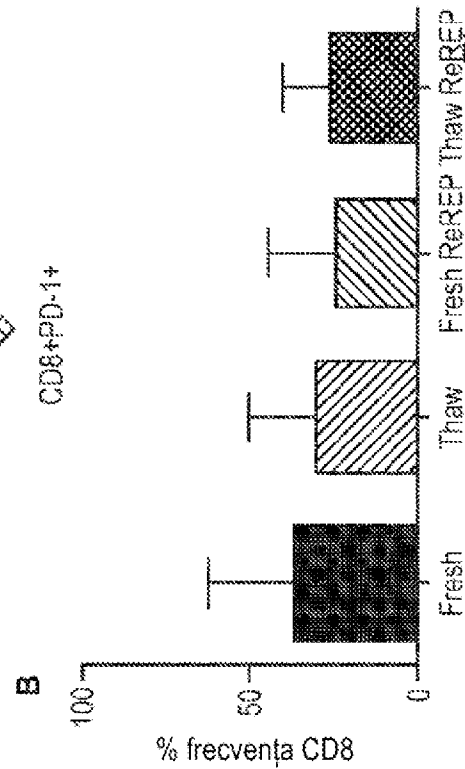
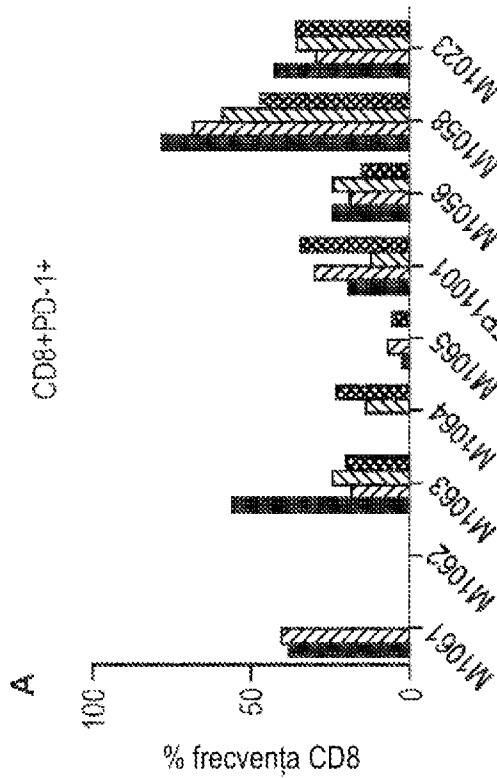


	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	37.85	37.03	24.13	34.34
SD	21.7	12.75	14.27	17.29
SEM	8.202	4.819	5.047	6.113

Figure 53

Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

■ Fresh
 ▨ Thaw
 ▩ Fresh ReREP
 ▪ Thaw ReREP



	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test	0.3144	0.7668
P-value	ns	ns
Summary	No	No
Significant	No	No

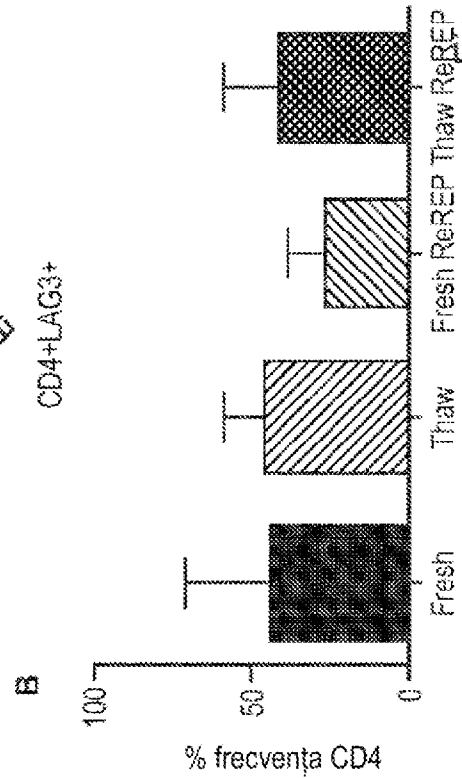
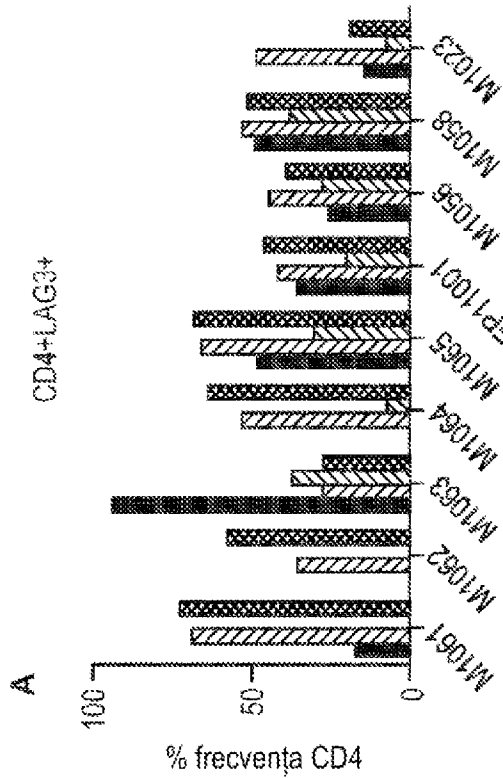
■ Fresh
 ▨ Thaw
 ▩ Fresh ReREP
 ▪ Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	36.96	30.22	24.63	26.03
SD	25.33	20	19.15	14.05
SEM	9.574	7.558	7.238	5.309

Figure 54

Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu, Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP



	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test	0.5234	0.0753
P-value	ns	ns
Summary	No	No
Significant	No	No

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	40.16	49.51	26.83	41.55
SD	27.15	14.38	11.5	17.87
SEM	10.26	5.435	4.695	7.297

Figure 55

Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoare p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test		
P-value	0.0884	0.0154
Summary	ns	+
Significant	No	Yes

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	87.74	95.59	62.71	92.13
SD	7.821	3.375	19.74	7.773
SEM	2.956	1.276	7.459	2.938

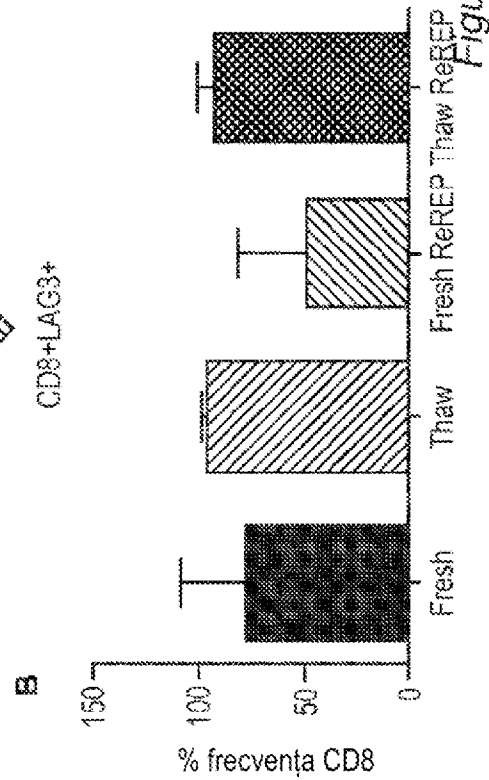
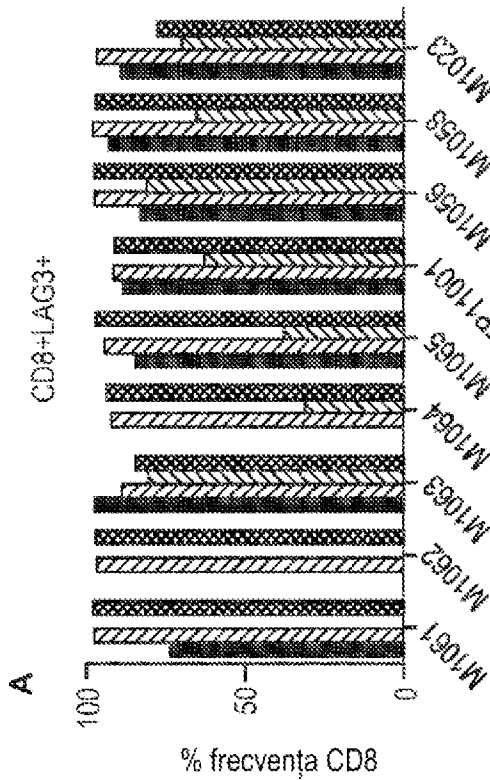
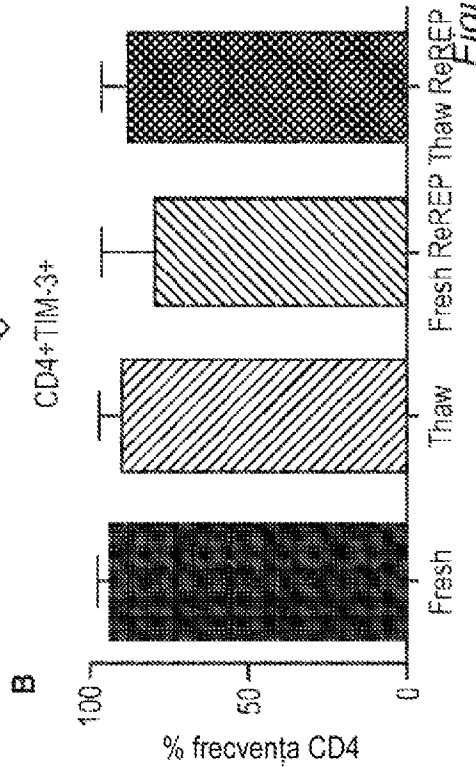
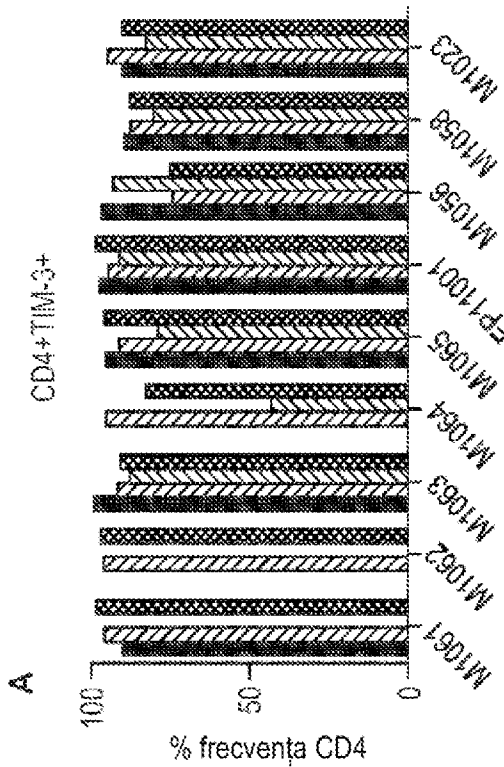


Figure 56

Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoare p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP



	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test		
P-value	0.2914	0.2007
Summary	ns	ns
Significant	No	No

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	93.56	89.49	79.43	88.6
SD	3.993	7.463	16.86	7.818
SEM	1.509	2.821	6.371	2.955

Figure 57

Fresh = proaspete
 Thaw = decongelate
 P-value = valoarea p
 Summary = rezumat
 Significant = semnificativ
 Mean = medie
 No = nu; Yes = da

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL vs Thawed TIL	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
T-Test	0.1835	0.0118
P-value	ns	*
Summary	No	Yes
Significant	No	Yes

Fresh
 Thaw
 Fresh ReREP
 Thaw ReREP

	Fresh TIL	Thawed TIL	Fresh reREP TIL	Thawed reREP TIL
Mean	76.34	97.44	58.19	97.68
SD	43.29	1.292	36.79	1.158
SEM	14.43	0.4308	12.26	0.3861

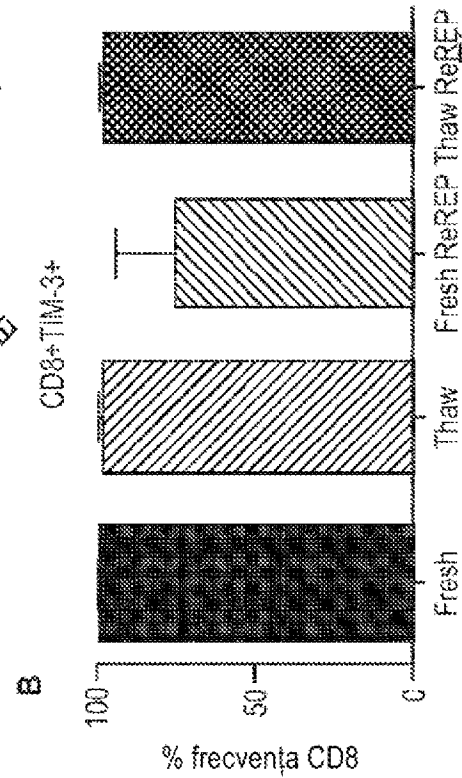
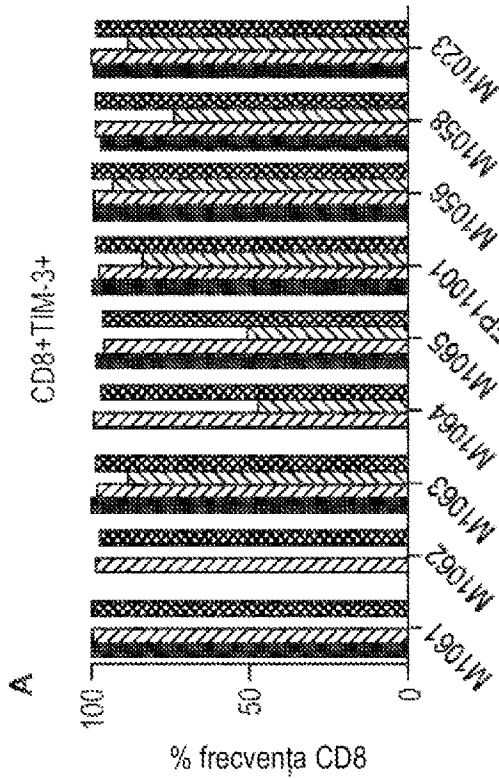
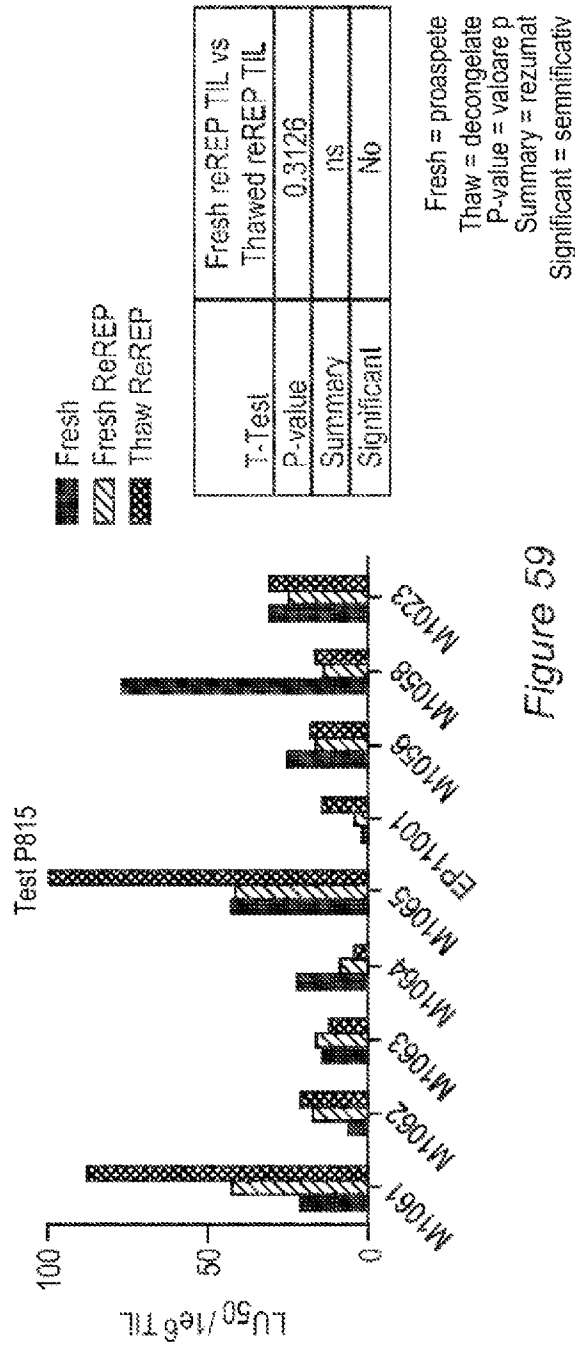


Figure 58



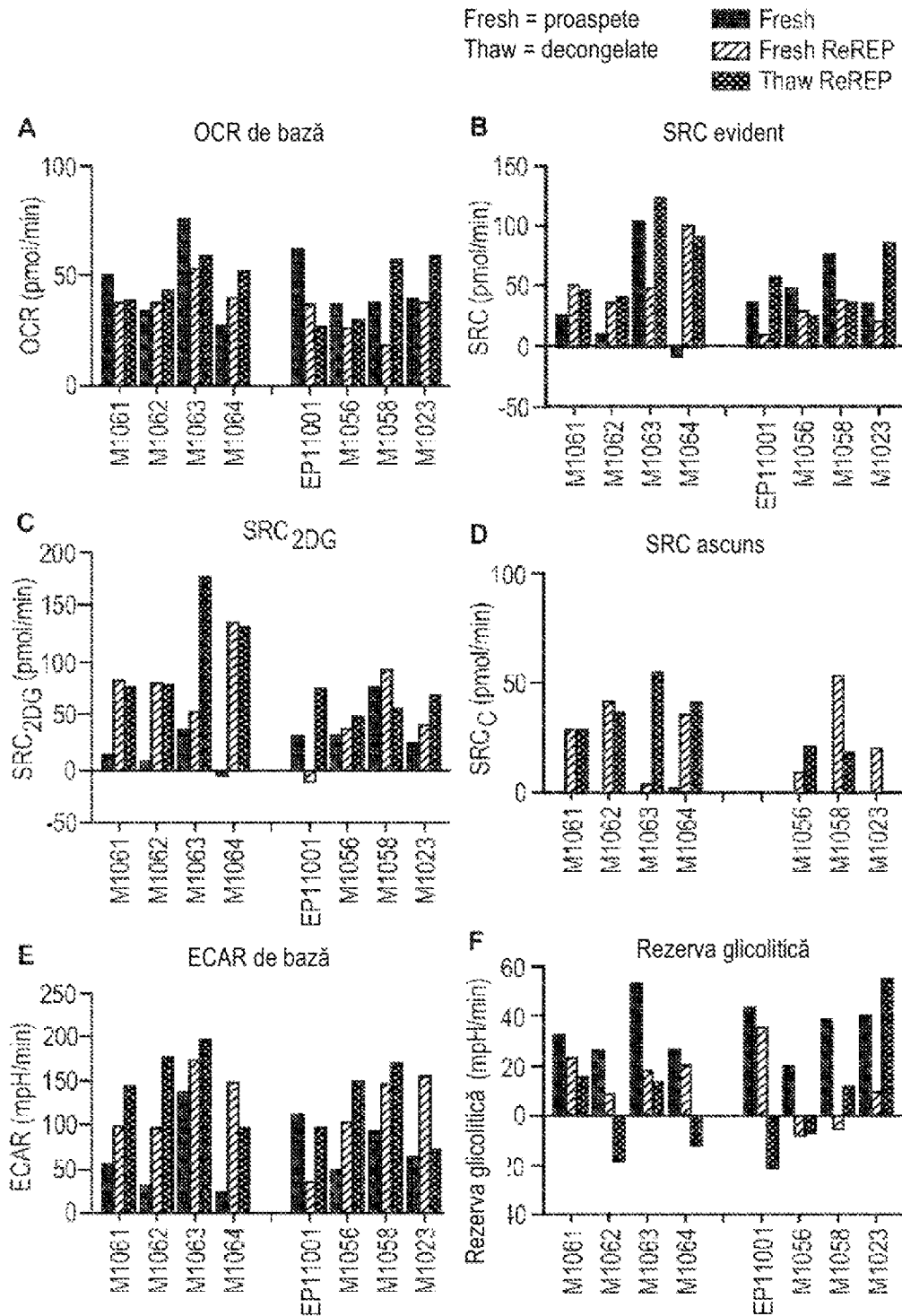


Figure 60

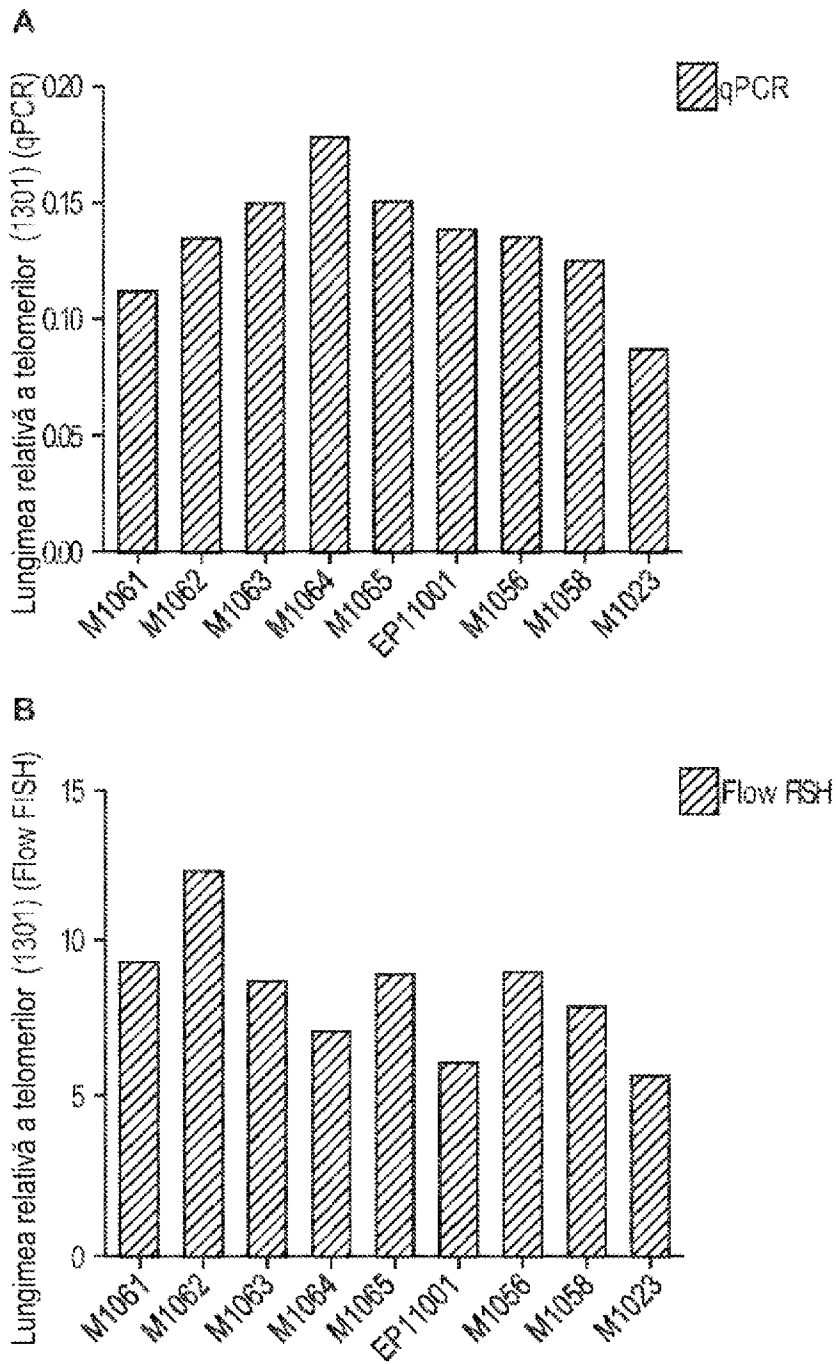
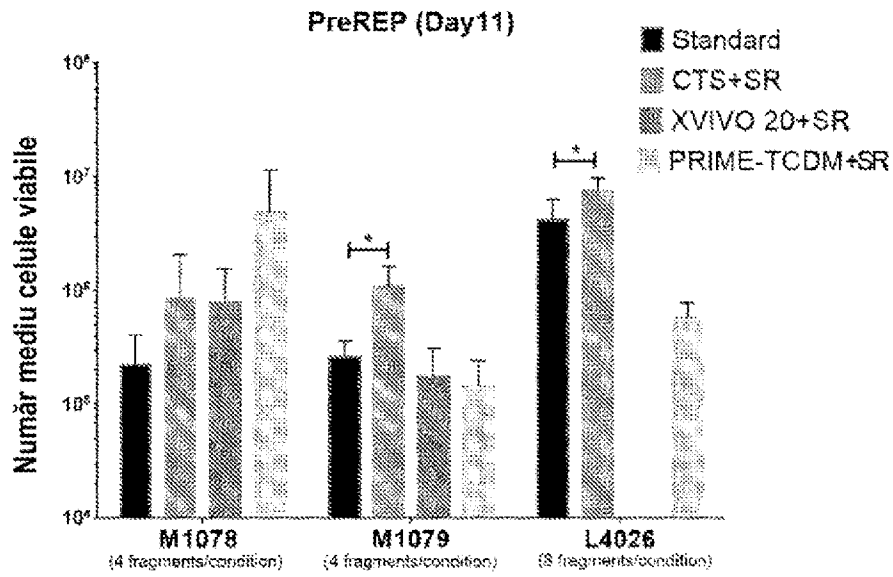


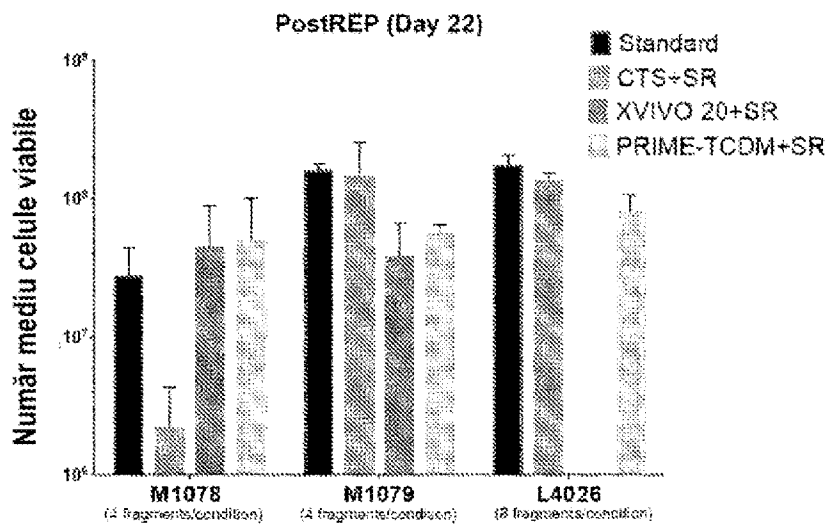
Figure 61

Figure 62

A)



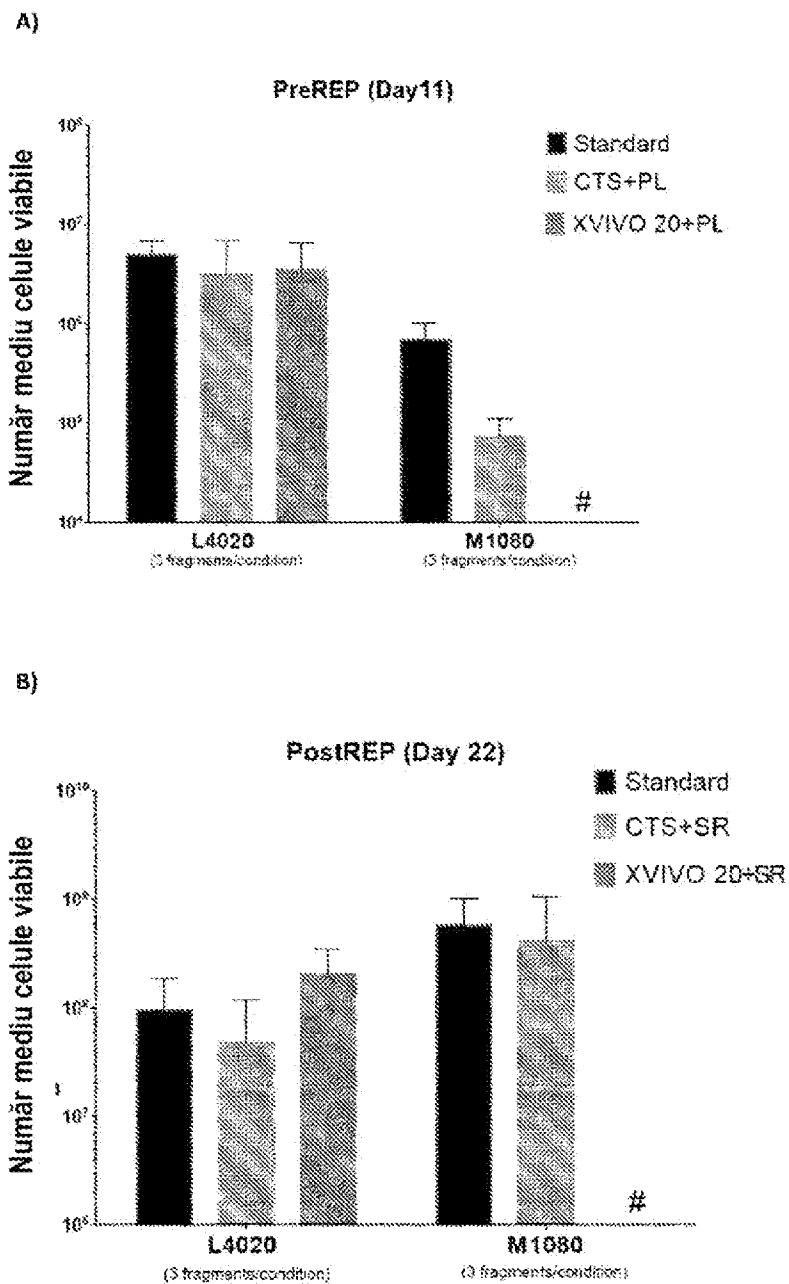
B)



Day = ziua

Fragments/condition = fragmente/condiție

Figure 63



Day = ziua

Fragments/condition = fragmente/condiție

Figure 64A

A)

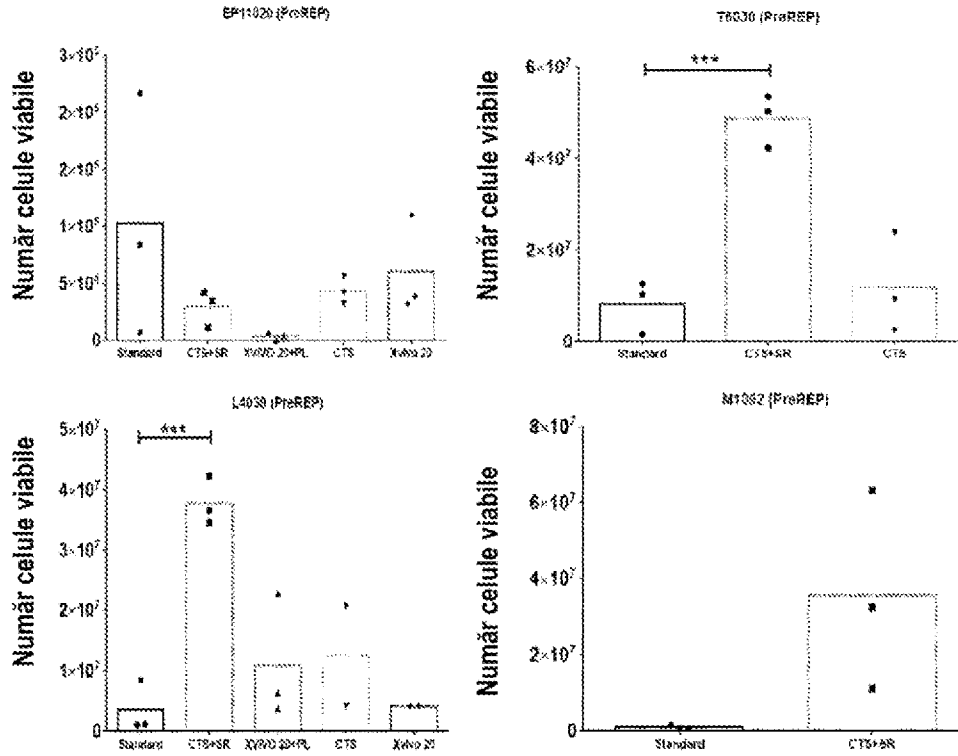


Figure 64B

B)

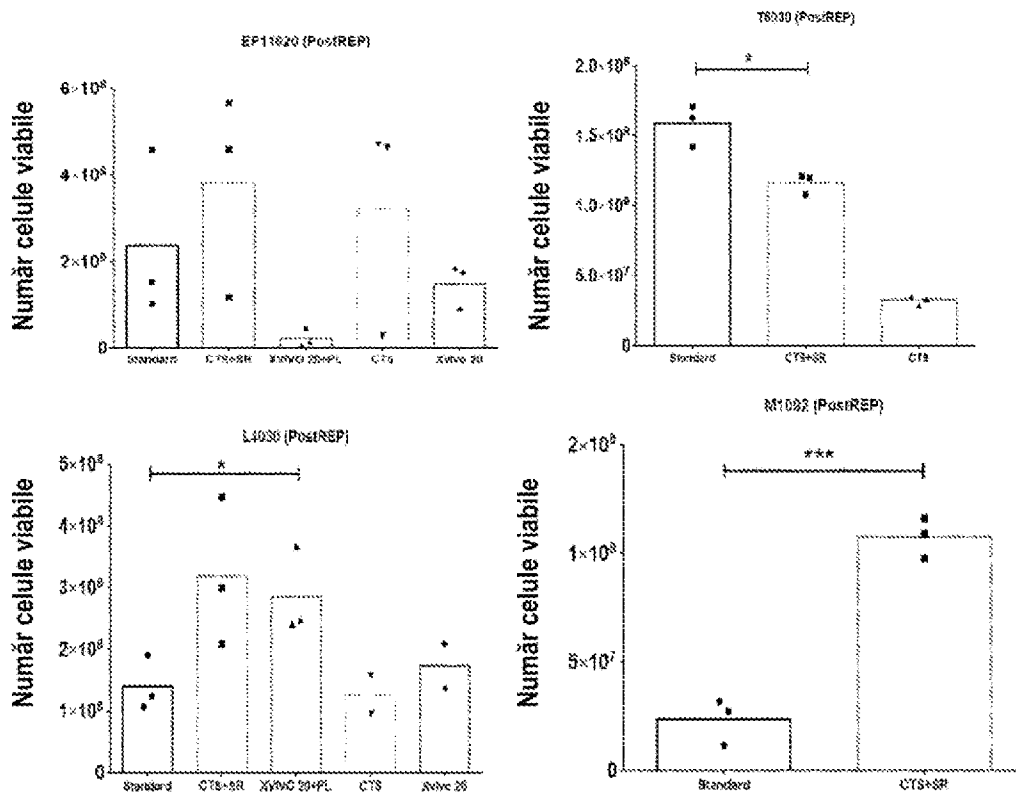


Figure 65A & 65B

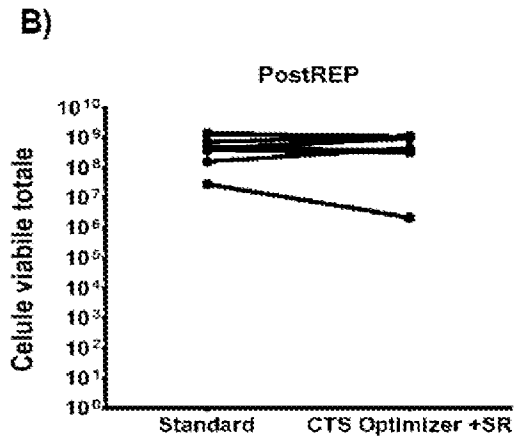
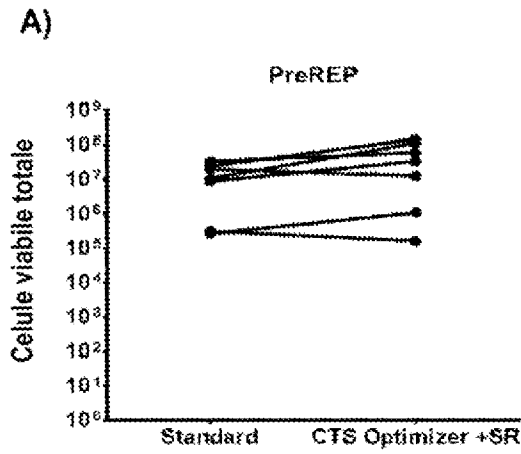


Figure 65C

C)

	Pre-REP Cell count			Post-REP Cell count		
	Standard	Număr celule	Optimizer +SR	Standard	Număr celule	Optimizer +SR
M1078	8.52E+07	3.38E+08		3.48E+09	2.73E+08	
M1079	2.66E+06	1.09E+07		1.96E+10	5.61E+10	
M1080						
L4020	1.98E+08	1.27E+06		4.75E+10	3.99E+10	
L4026	1.68E+08	3.02E+08		8.83E+10	6.69E+10	
L4030	7.05E+07	7.48E+08		2.83E+10	5.96E+10	
EP11020	2.04E+06	1.06E+06		4.44E+10	7.14E+10	
IG030	1.61E+08	8.64E+06		2.96E+10	2.18E+10	
M1092	2.00E+07	7.05E+08		4.41E+09	2.02E+10	

Figure 66

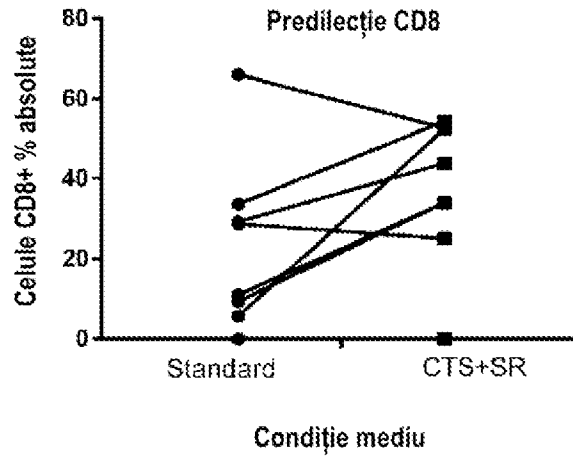
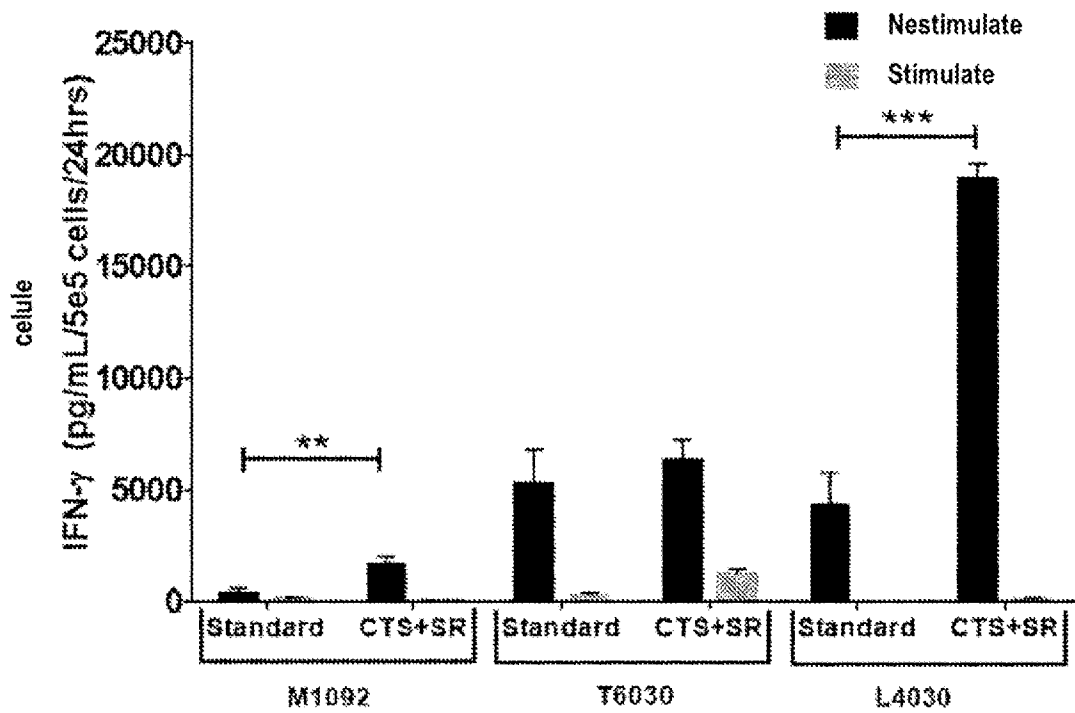


Figure 67



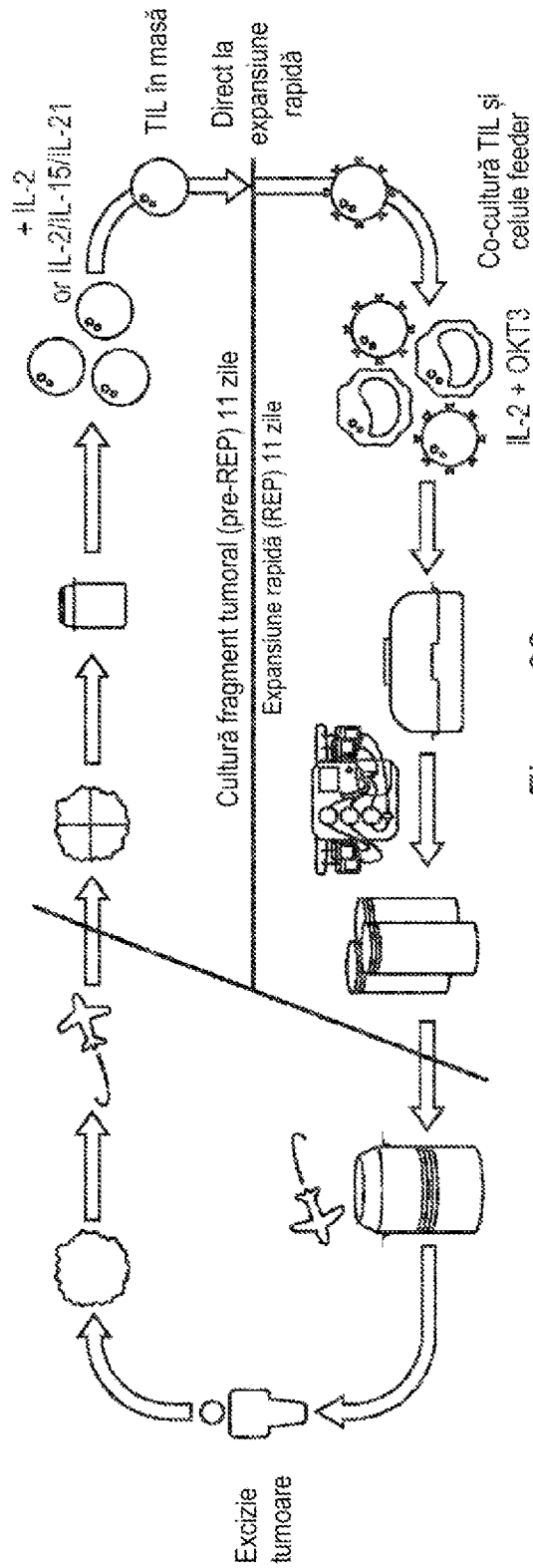


Figure 68

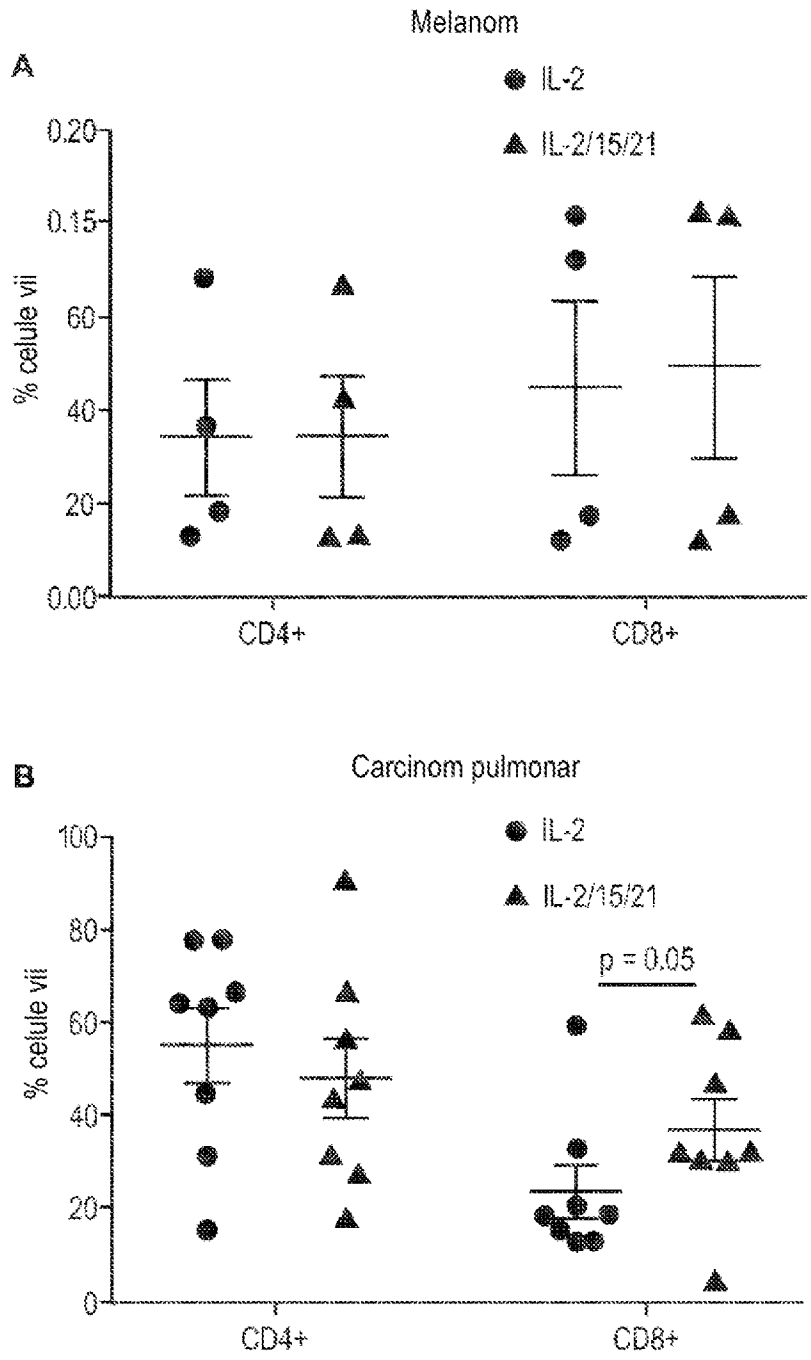


Figure 69

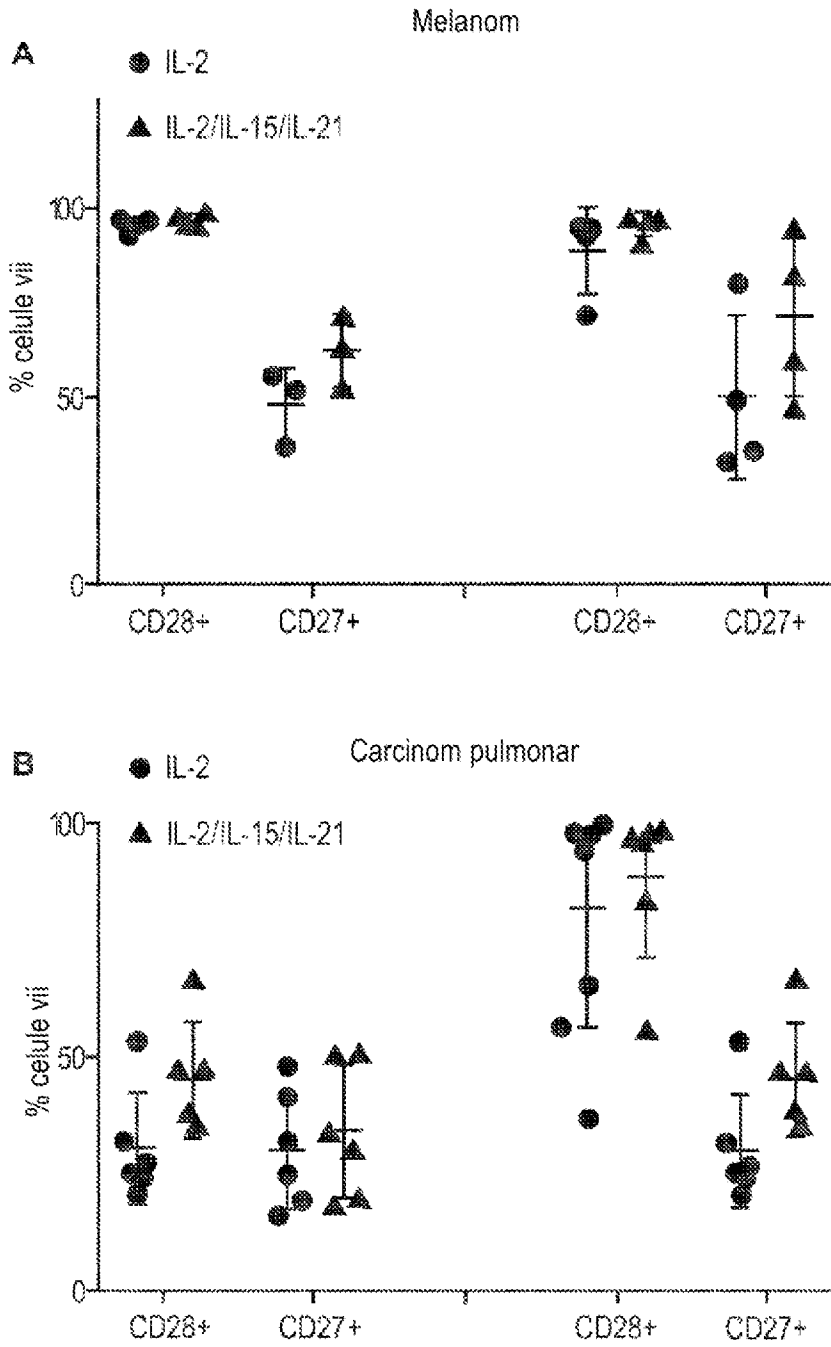


Figure 70

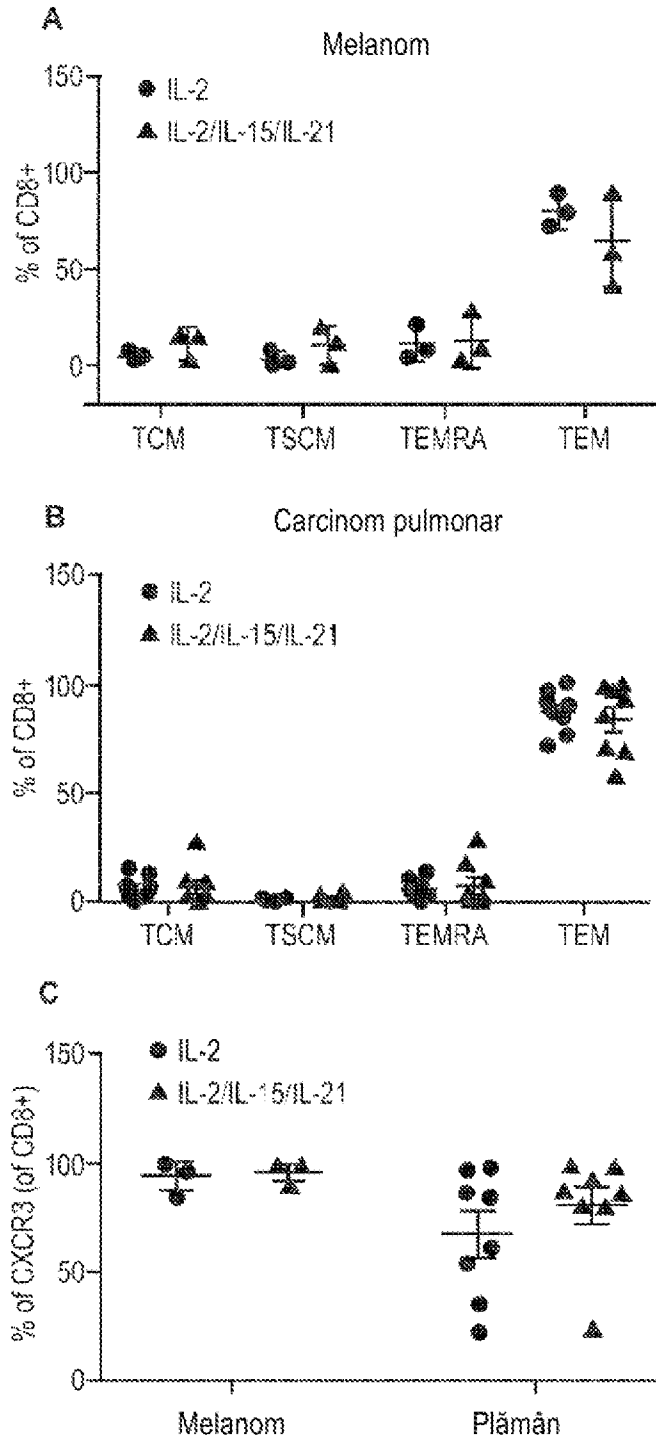


Figure 71

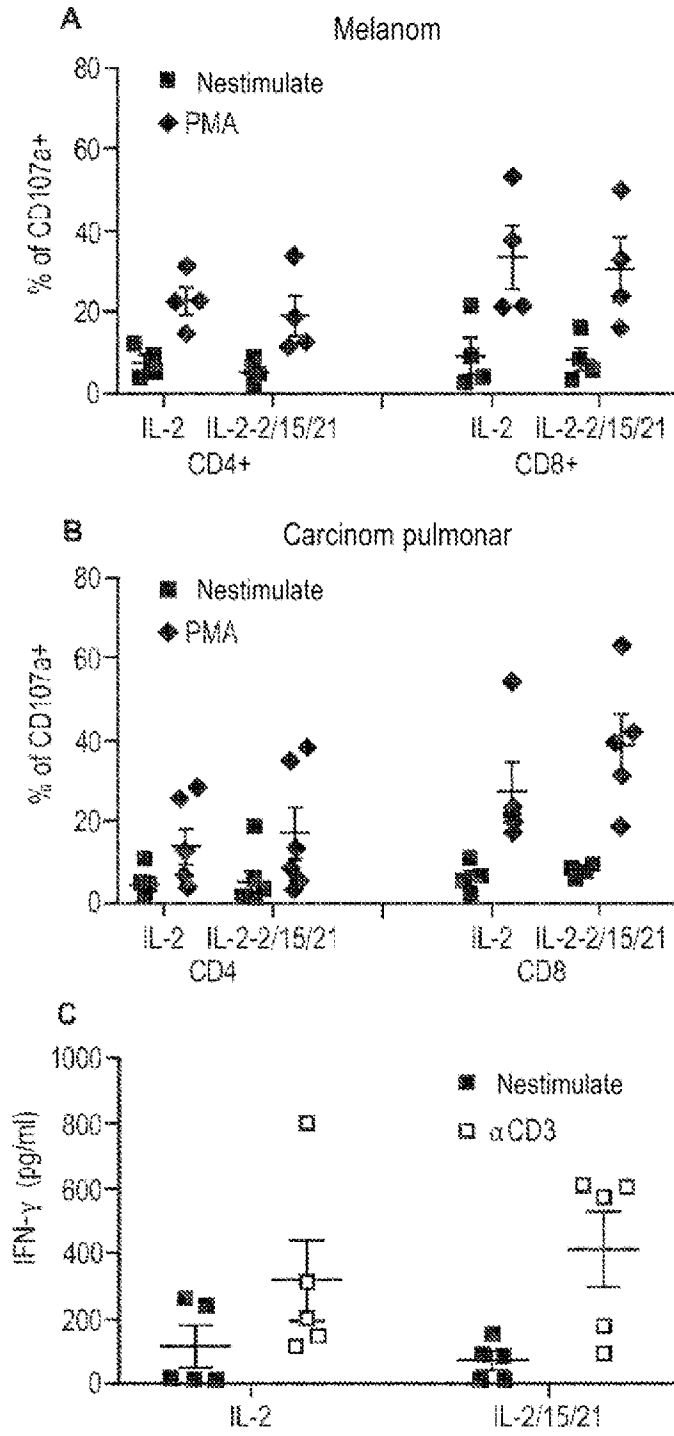
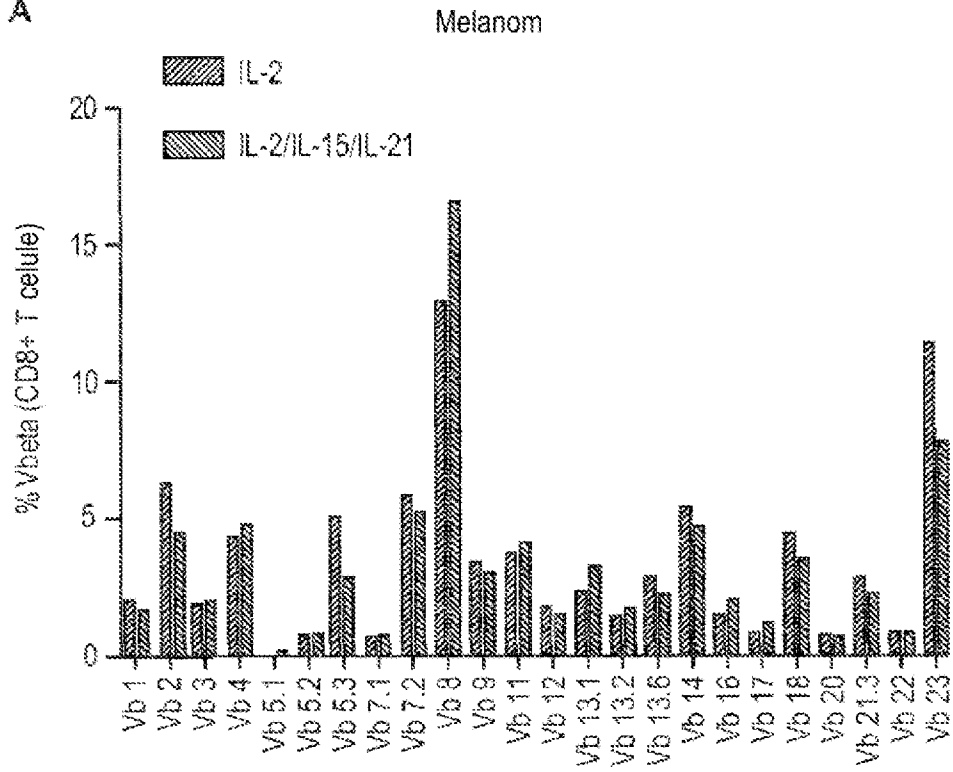


Figure 72

A



IL-2

IL-2/IL-15/IL-21

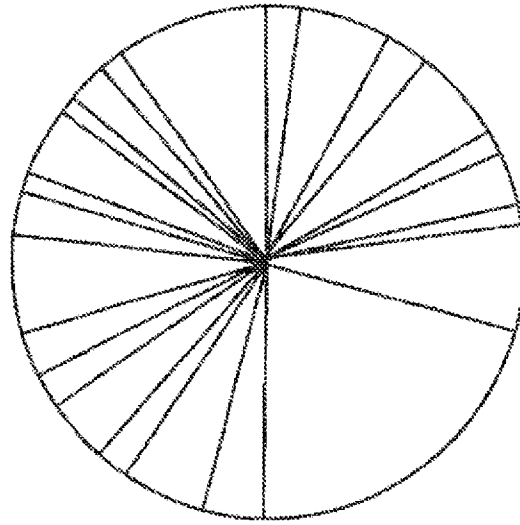
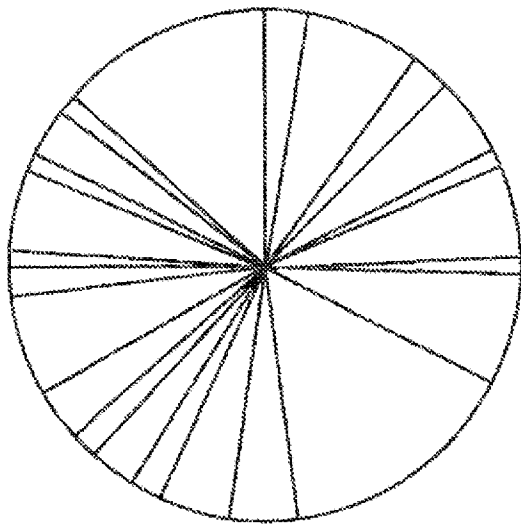


Figure 73A

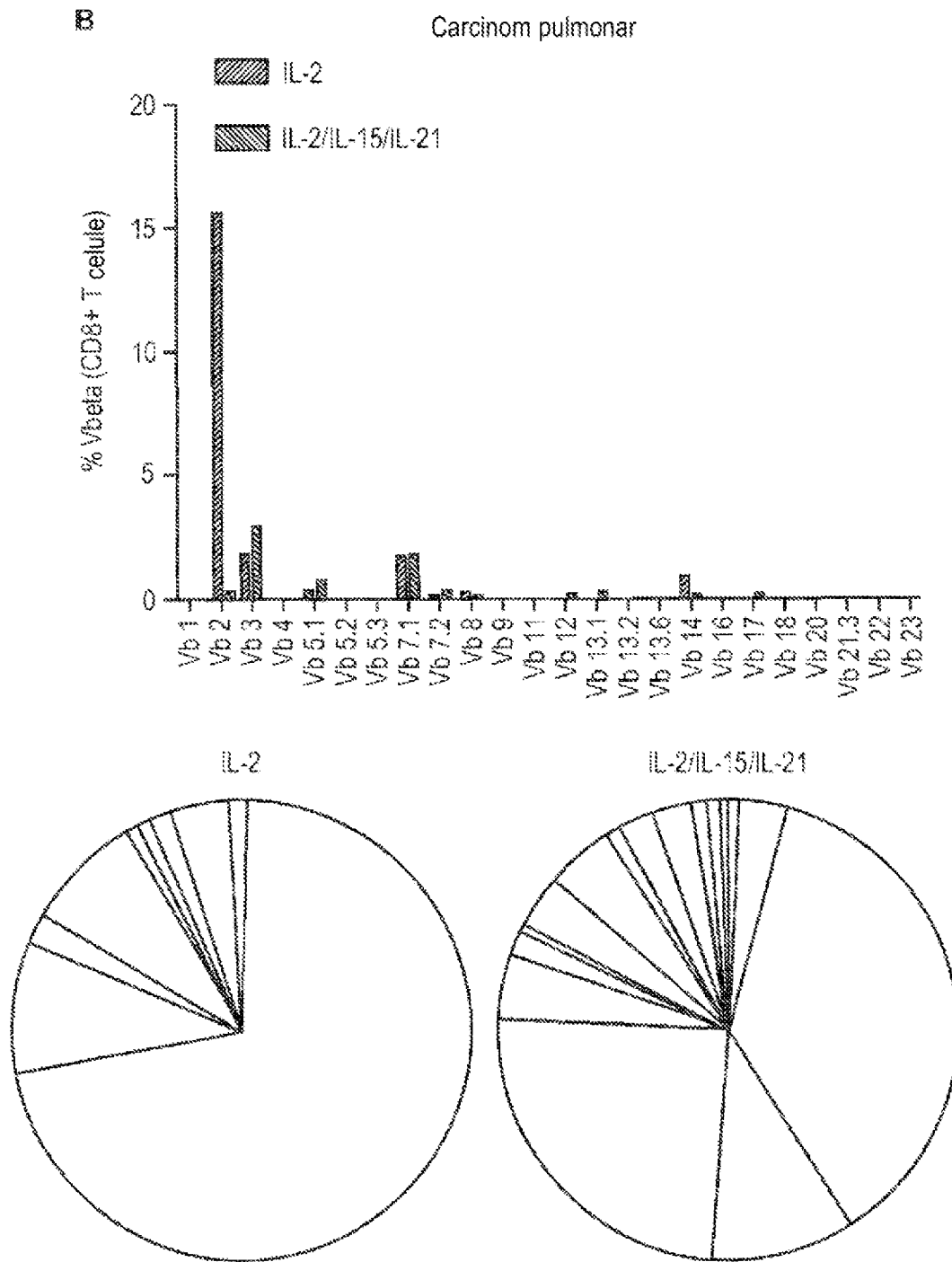


Figure 73B

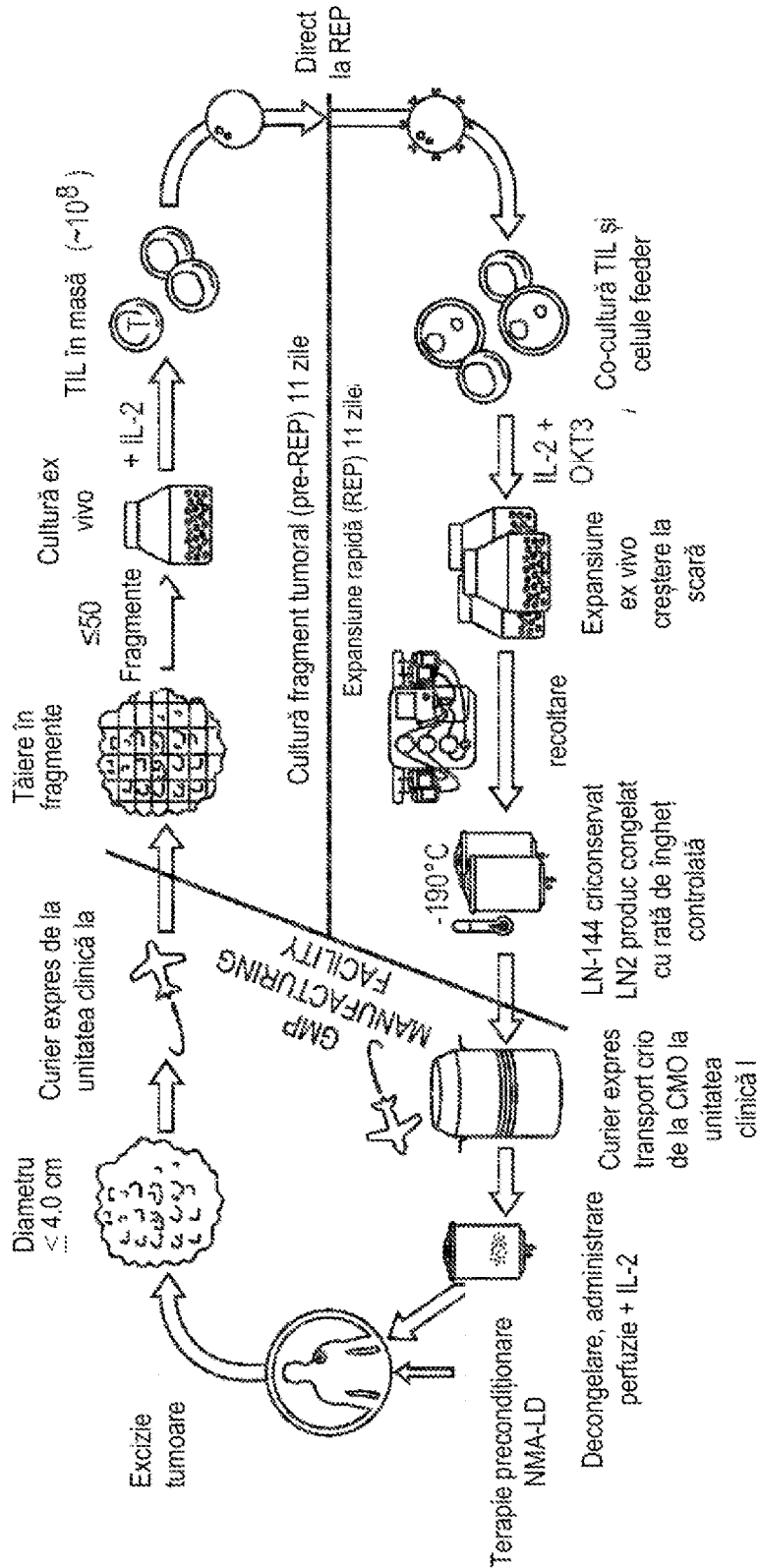
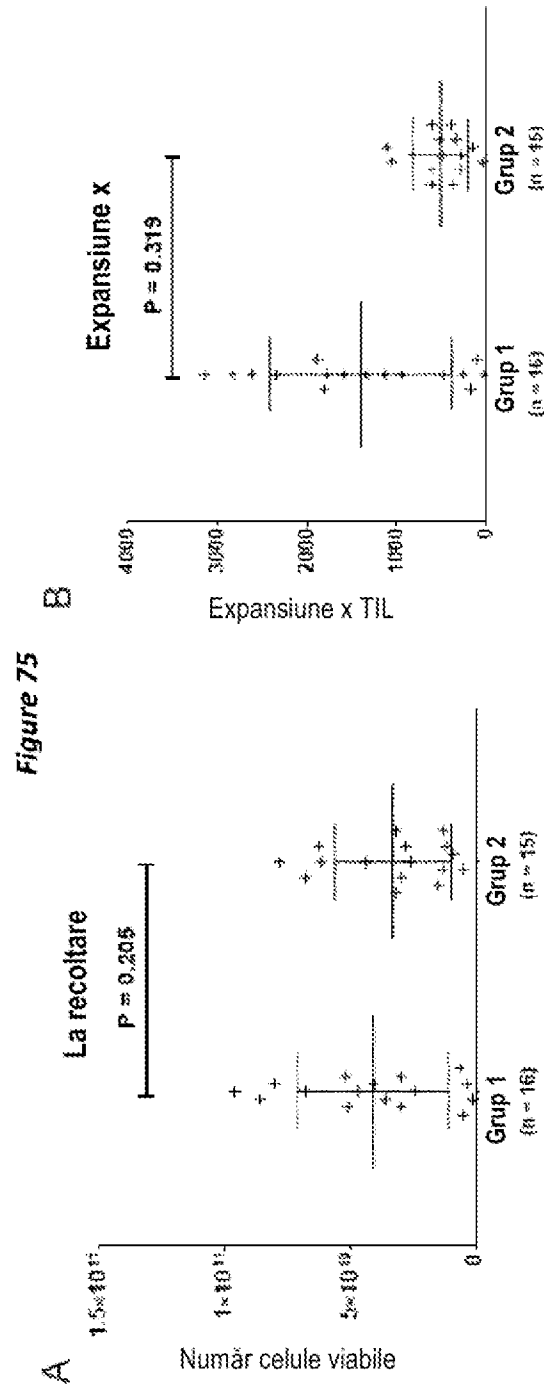
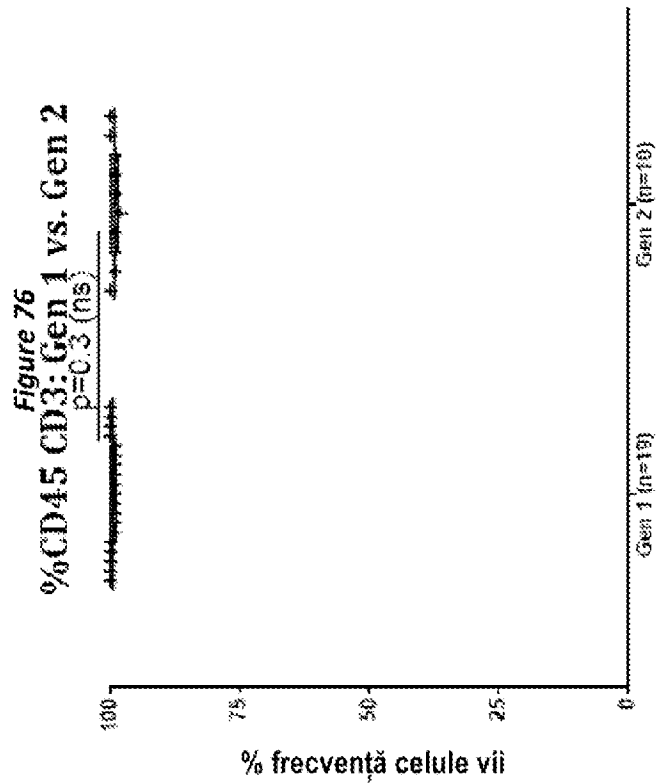
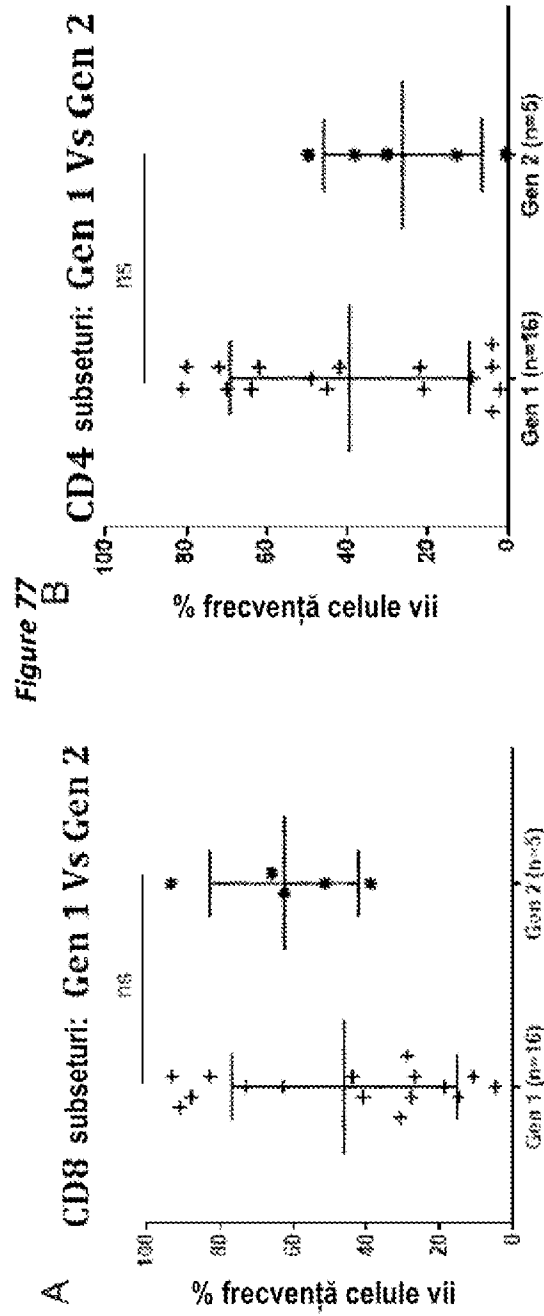


Figure 74

GMP MANUFACTURING FACILITY = FACILITATE DE MANUFATURARE GMP







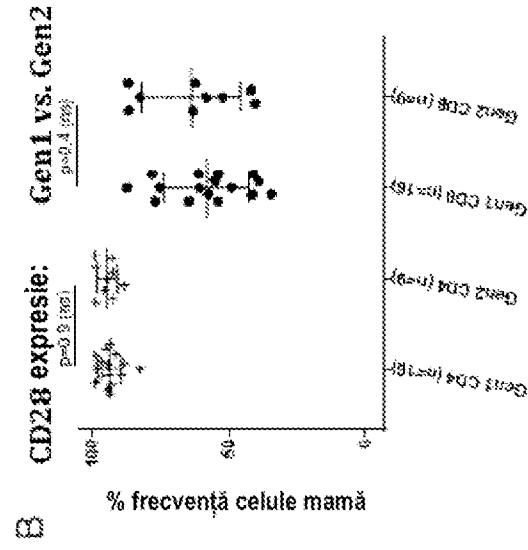
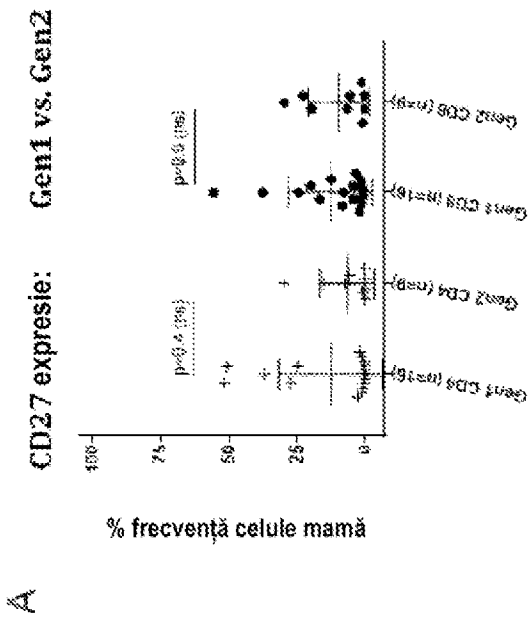
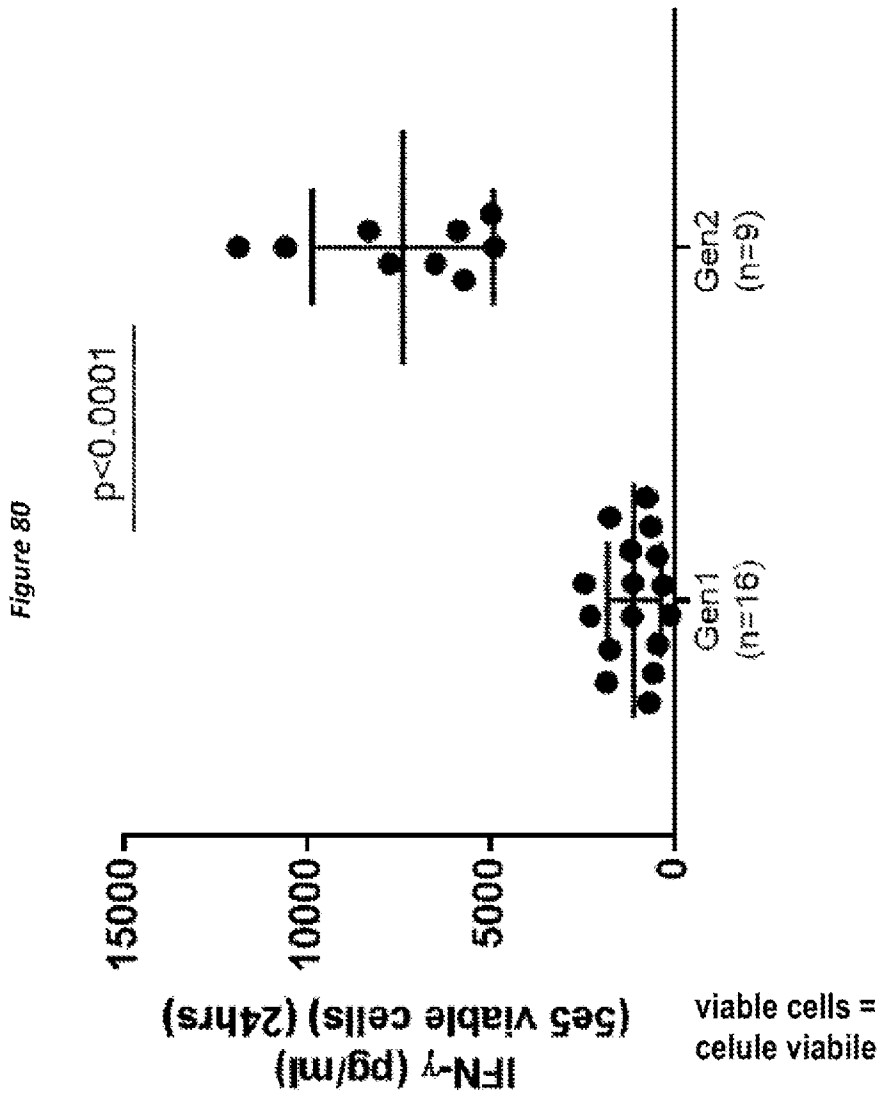
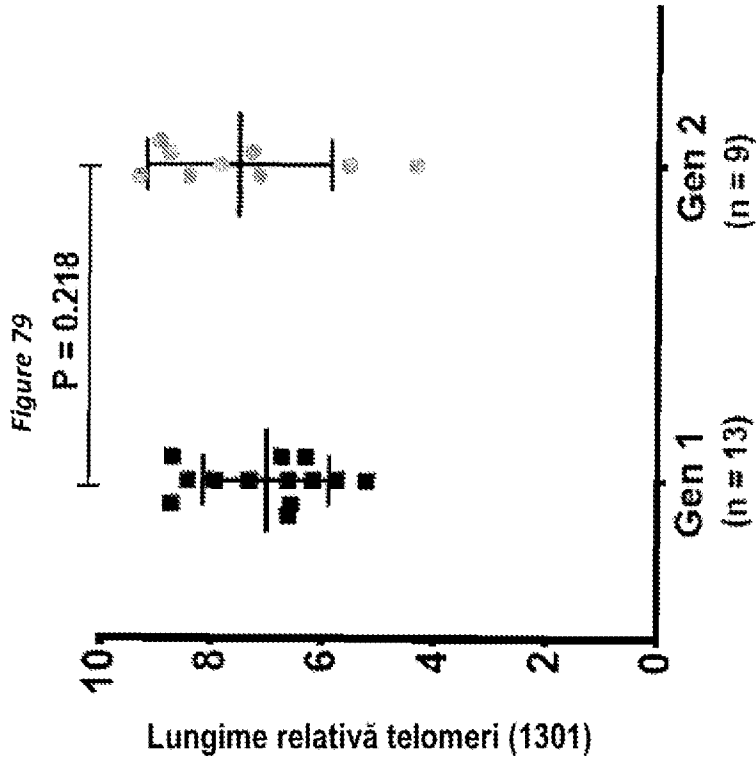
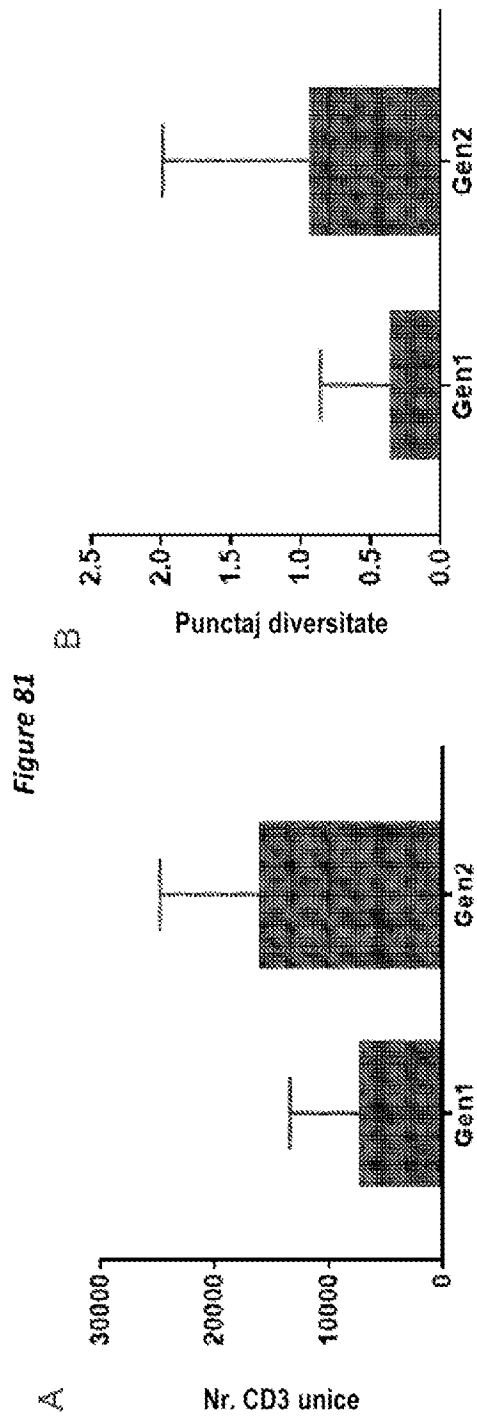


Figure 78







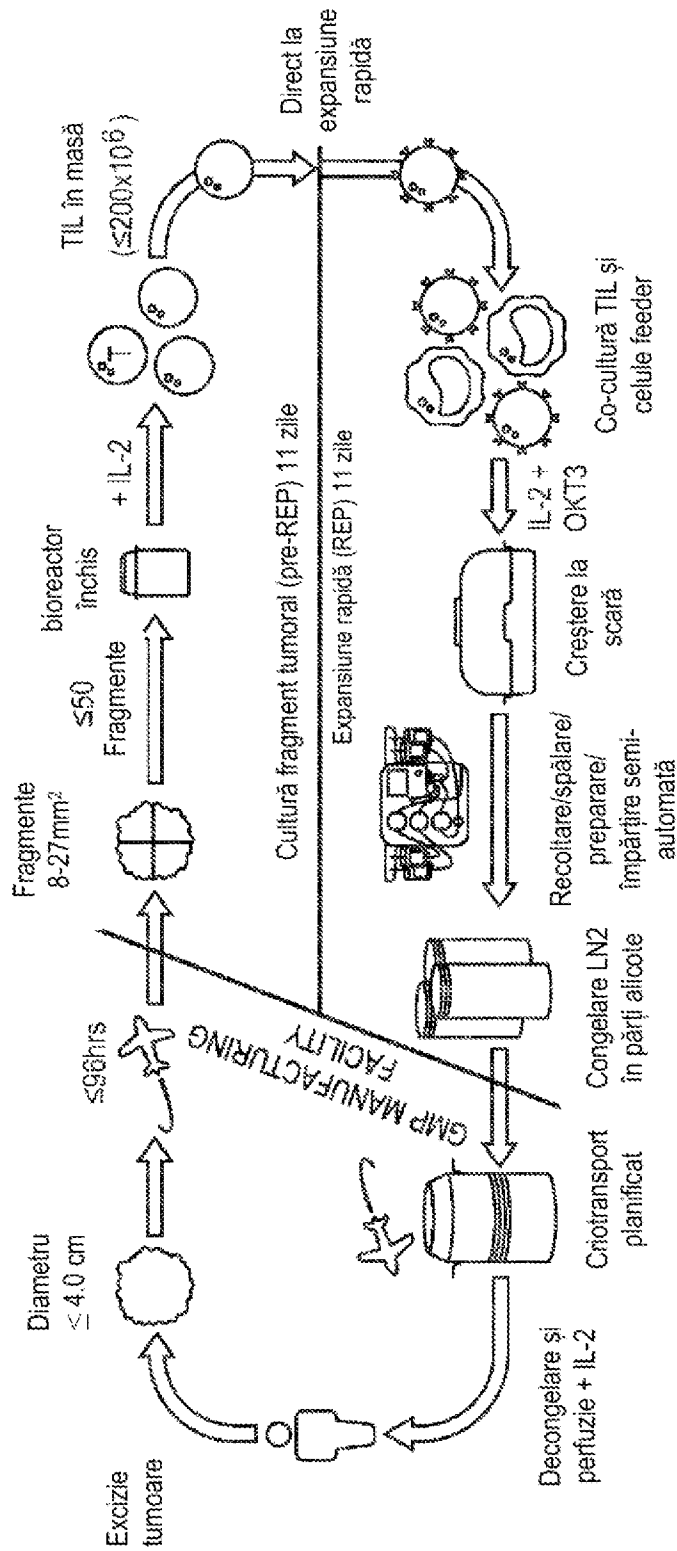


Figure 82

GMP MANUFACTURING FACILITY = FACILITATE DE MANUFATURARE GMP

Figure 83

Proces 1C: 43-55 zile pentru Etapele A-E Proces 2A: circa 22 zile pentru Etapele A-E

Process 1C: 43-55 Days for Steps A - E	Process 2A: about 22 days from Steps A - E
<p>1. <u>STEP A</u> Obtain Patient Tumor Sample</p>	<p>2. <u>STEP A</u> Obtain Patient Tumor Sample</p>
<p>3. <u>STEP B</u> Fragmentation and First Expansion 11 days to 21 days</p>	<p>3. <u>STEP B</u> Fragmentation and First Expansion 3 days to 14 days</p>
<p>3. <u>STEP C</u> First Expansion to Second Expansion Transition Optional Storage until Selection</p>	<p>4. <u>STEP C</u> First Expansion to Second Expansion Transition No Storage and Closed System</p>
<p>5. <u>STEP D</u> Second Expansion IL-2, OKT-3, antigen-presenting feeder cells Optionally repeat one or more times</p>	<p>5. <u>STEP D</u> Second Expansion IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells Closed System</p>
<p>6. <u>STEP E</u> Harvest TILS from Step D</p>	<p>7. <u>STEP E</u> Harvest TILS from Step D Closed System</p>
<p>6. <u>STEP F</u> Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag</p>	<p>8. <u>STEP F</u> Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)</p>

STEP = ETAPA

Etapă A. Obținerea probei tumorale de la pacient

Etapă B. Fragmentare și prima expansiune
11 zile - 21 zile

Etapă C. Tranziție de la prima la a doua expansiune

Depozitare opțională până la selecție

Etapă D. A doua expansiune
IL-2, OKT-3 și celule feeder de prezentare a antigenului

Opțional repetare o dată sau de mai multe ori

Etapă E. Recoltare TIL din etapa D

Etapă F. Compoziție finală și/sau transfer în pungă de perfuzie

Etapă A. Obținerea probei tumorale de la pacient

Etapă B. Fragmentare și prima expansiune
3 zile - 14 zile

Etapă C. Tranziție de la prima la a doua expansiune

Fără depozitare și sistem închis

Etapă D. A doua expansiune
IL-2, OKT-3 și celule feeder de prezentare a antigenului

Sistem închis

Etapă E. Recoltare TIL din etapa D

Sistem închis

Etapă F. Compoziție finală și/sau transfer în pungă de perfuzie (opțional crioconservare)

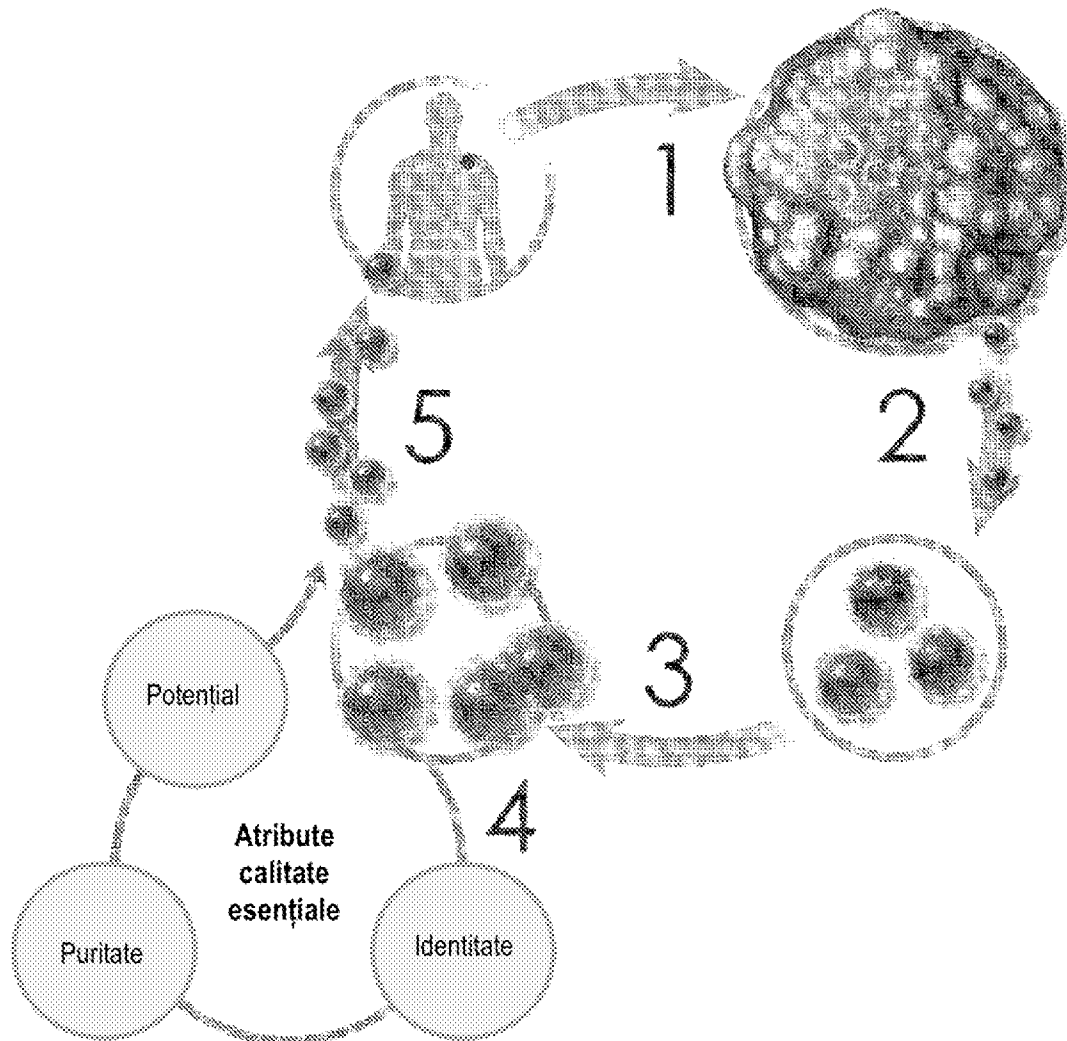
Figure 84

Process Step	Process 1C Embodiment	Process 2A Embodiment	Advantages
Pre-REP	<ul style="list-style-type: none"> 4 fragments per 10 GREX-10 flasks 11-21 day duration 	<ul style="list-style-type: none"> 40 fragments per 1 GREX-100M flask 11 day duration 	<ul style="list-style-type: none"> Increased tumor fragments per flask Shortened culture time Reduced number of steps Amenable to closed system
Pre-REP to REP Transition	<ul style="list-style-type: none"> Pre-REP TIL are frozen and phenotyped for selection then thawed to proceed to the REP (~day 30) REP requires >40x10⁶ TIL 	<ul style="list-style-type: none"> Pre-REP TIL directly move to REP on day 11 REP requires 25-200x10⁶ TIL 	<ul style="list-style-type: none"> Shortened pre-REP-to-REP process Reduced number of steps Eliminated phenotyping selection Amenable to closed system
REP	<ul style="list-style-type: none"> 6 GREX-100M flasks on REP day 0 5x10⁶ TIL and 5x10⁶ PBMC feeders per flask on REP day 0 Split to 35-36 flasks on REP day 7 14 day duration 	<ul style="list-style-type: none"> 1 GREX-500M flask on day 11 25-200x10⁶ TIL and 5x10⁶ PBMC feeders on day 11 Split to ≤ 6 GREX-500M flasks on day 16 14 day duration 	<ul style="list-style-type: none"> Reduced number of steps Shorter REP duration Closed system transfer of TIL between flasks Closed system media exchanges
Harvest	<ul style="list-style-type: none"> TIL harvested via centrifugation 	<ul style="list-style-type: none"> TIL harvested via LOVD automated cell washing system 	<ul style="list-style-type: none"> Reduced number of steps Automated cell washing Closed system Reduced loss of product during wash
Final Formulation	<ul style="list-style-type: none"> Fresh product in Hypoosmolar Single infusion bag Limited shipping stability 	<ul style="list-style-type: none"> Cryopreserved product in Plasmalyte-A + 1% BSA and CS10 stored in LN₂ Multiple aliquots Longer shipping stability 	<ul style="list-style-type: none"> Shipping flexibility Flexible patient scheduling More timely release testing
Overall Estimated Process Time	<ul style="list-style-type: none"> 43-55 days 	<ul style="list-style-type: none"> 22 days 	<ul style="list-style-type: none"> Faster turnaround to patient

Etapă proces	Proces 1C - aplicare	Proces 2A - aplicare	Avantaje
Pre-REP	<ul style="list-style-type: none"> 4 fragmente per 10 G-REX -10 baloane durată 11-21 zile 	<ul style="list-style-type: none"> 40 fragmente per 1 balon G-REX -100M durată 11 zile 	<ul style="list-style-type: none"> Fragmente tumorale mărite pe balon Timp de cultură scurtat Număr redus de etape Adaptabil la sistem închis
Tranzitie pre-REP in REP	<ul style="list-style-type: none"> TIL pre-REP sunt congelate până la fenotipare pentru selecție, apoi se decongelează pentru continuare la REP (~ziua 30) REP necesită >40x10⁶ TIL 	<ul style="list-style-type: none"> TIL pre-REP trec direct în REP în ziua 11 REP necesită 25-200x10⁶ TIL 	<ul style="list-style-type: none"> Proces pre-REP - REP scurtat Număr redus de etape Selecție de fenotipare eliminată Adaptabil la sistem închis
REP	<ul style="list-style-type: none"> 6 baloane G-REX -100M în ziua 0 REP 	<ul style="list-style-type: none"> 1 balon G-REX -500M în ziua 11 	<ul style="list-style-type: none"> Număr redus de etape Durată REP mai scurtă Transfer TIL în sistem închis între baloane Schimb de mediu în sistem închis

Etapă proces	Proces 1C - aplicare	Proces 2A - aplicare	Avantaje
	<ul style="list-style-type: none"> • 5×10^9 TiL și 5×10^8 feeder PBMC per balon în ziua 0 REP 	<ul style="list-style-type: none"> • $25-200 \times 10^6$ TiL și 5×10^8 feeder PBMC în ziua 11 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Separare în 18-36 baloane în ziua 7 REP 	<ul style="list-style-type: none"> • Separare în ≤ 6 baloane G-REX - 500M în ziua 16 	
	<ul style="list-style-type: none"> • durată 14 zile 	<ul style="list-style-type: none"> • durată 11 zile 	
Recoltare	<ul style="list-style-type: none"> • TiL recoltate prin centrifugare 	<ul style="list-style-type: none"> • TiL recoltate prin sistem de spălare celulară automată LOVO' 	<ul style="list-style-type: none"> Număr redus de etape Spălare celulară automată Sistem închis Pierdere redusă de produs în timpul spălării
Compoziție finală	<ul style="list-style-type: none"> • Produs proaspăt în Hypothermosol 	<ul style="list-style-type: none"> • Produs crioconservat în PlasmaLyte-A + 1% HSA și CS10 depozitat în LN₂ 	<ul style="list-style-type: none"> Flexibilitate transport Programare flexibilă pacienți Testare de eliberare mai rapidă
	<ul style="list-style-type: none"> • O singură pungă de perfuzie 	<ul style="list-style-type: none"> • Părți alicote multiple 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilitate limitată la transport 	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilitate mai îndelungată la transport 	
Timp total estimat	<ul style="list-style-type: none"> • 43-55 zile 	<ul style="list-style-type: none"> • 22 zile 	<ul style="list-style-type: none"> Revenire mai rapidă la pacient

Figure 85



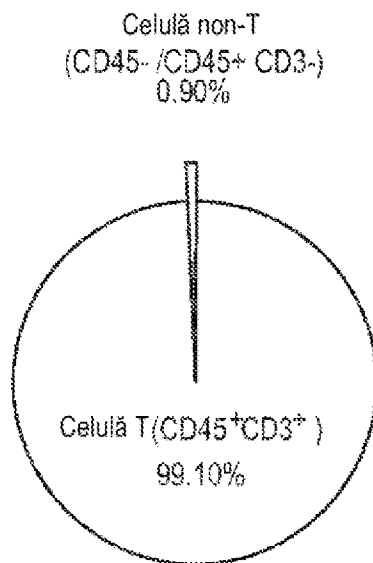


Figure 86A

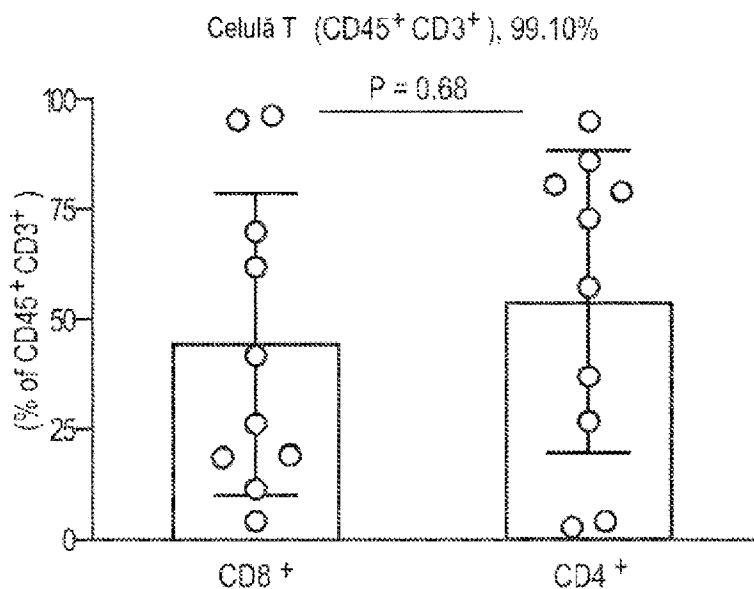


Figure 86B

Celulă non-T
(CD45⁻ /CD45⁺ CD3⁻), 0.90%

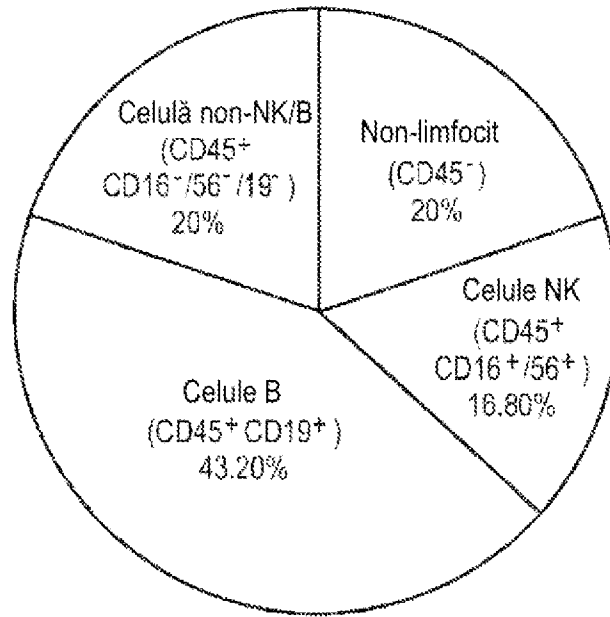


Figure 86C

CD4+

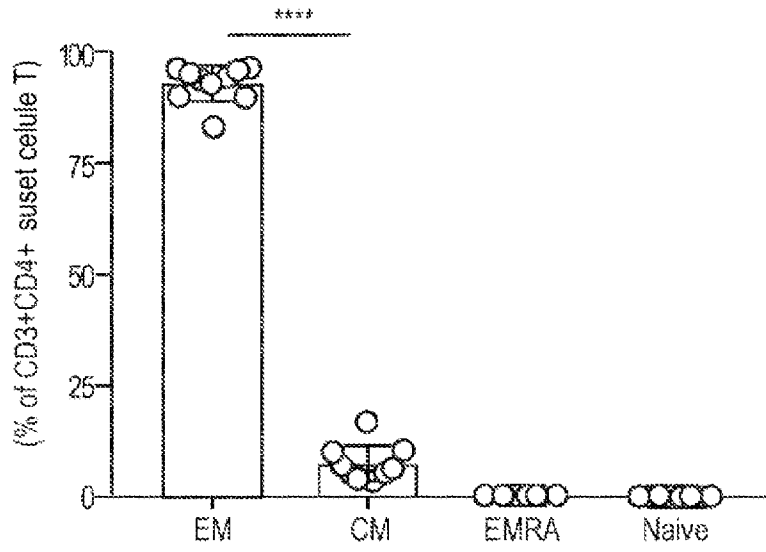


Figure 87A

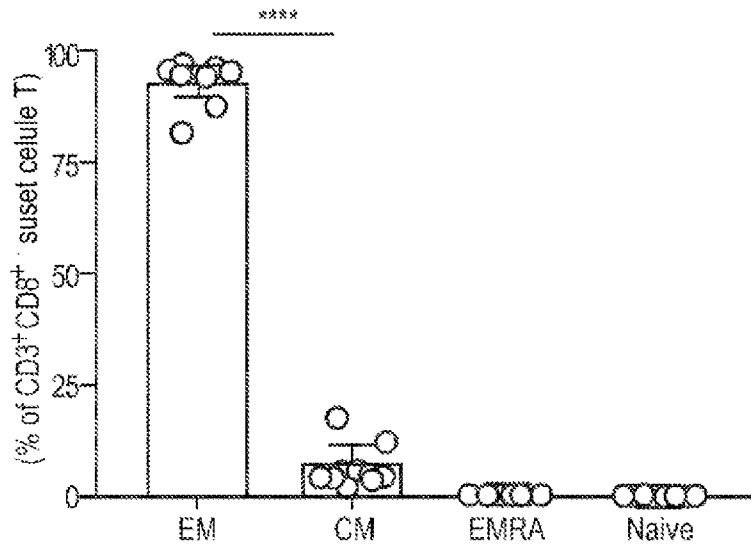


Figure 87B

256

MCSP

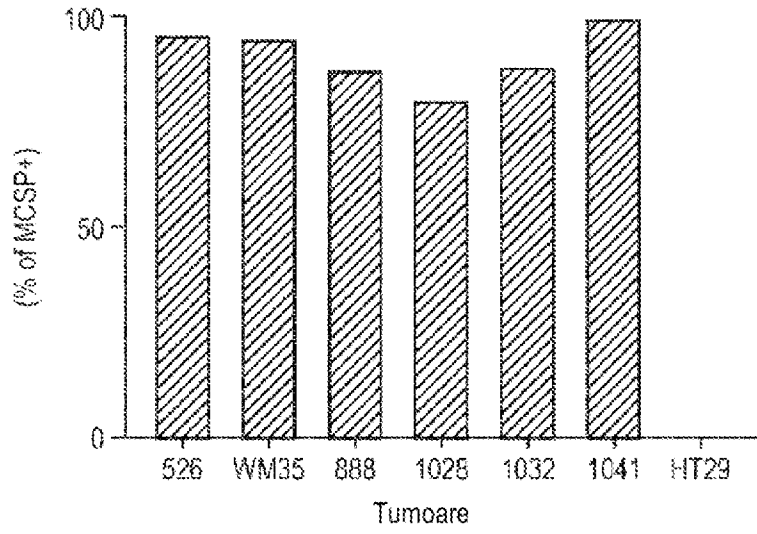


Figure 88A

EpCAM

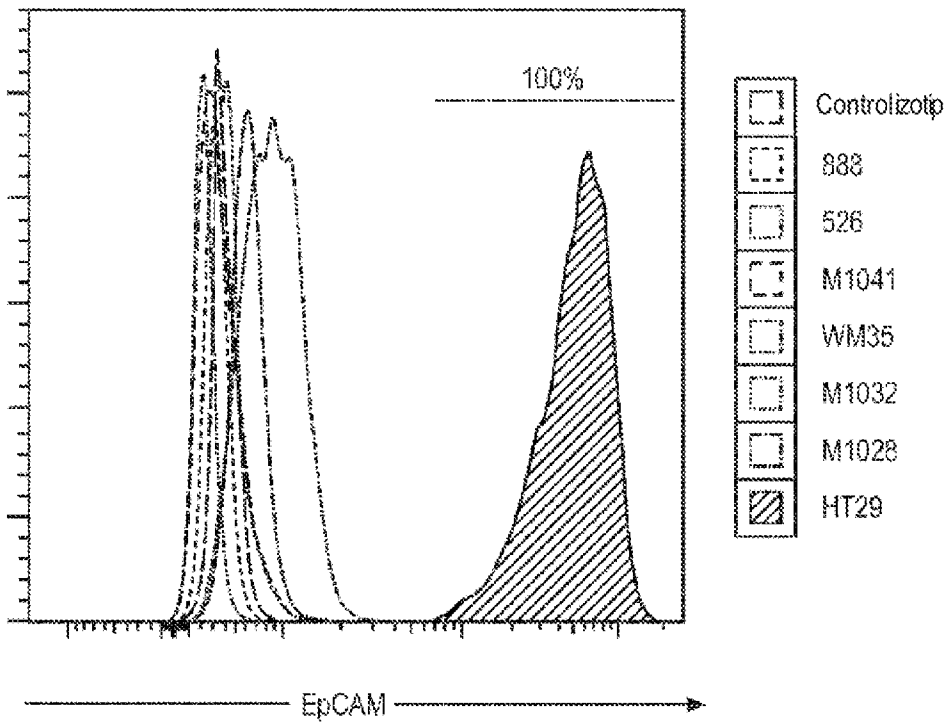


Figure 88B

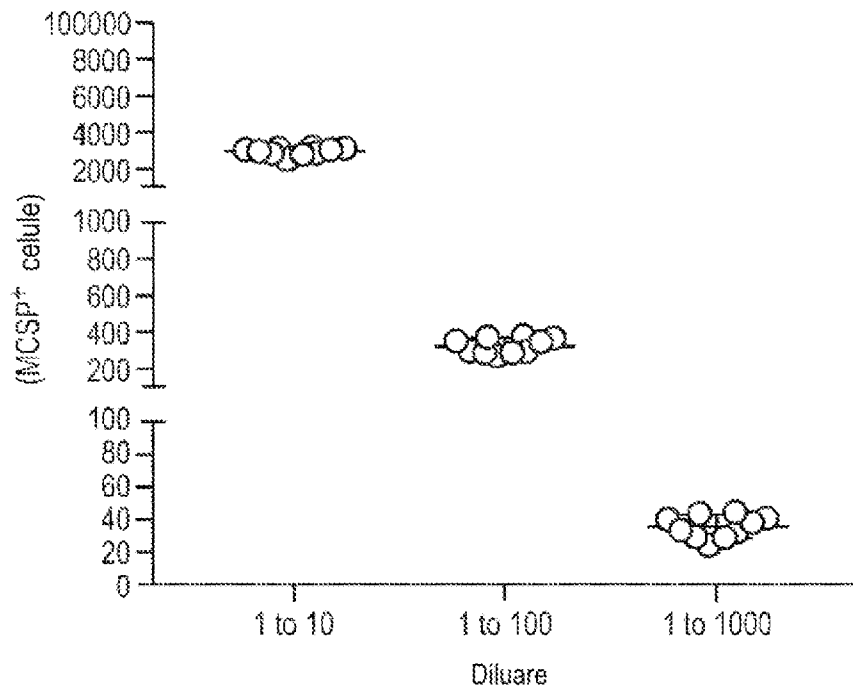


Figure 89A

DILUARE	AV	SD	LIMITĂ SUPERIOARĂ (AV + 3SD)	LIMITĂ INFERIOARĂ (AV - 3SD)
1 to 10	2976	203	3585	2367
1 to 100	322	39	440	204
1 to 1000	36	7	56	16

Figure 89B

DILUARE	INTERVAL (SUPERIOR - INFERIOR)	EXP#1 (AV)	EXP#2 (AV)	EXP#3 (AV)
1 to 10	3585-2367	2814	3282	2367
1 to 100	440-204	227	320	239
1 to 1000	56-16	27	25	32

Figure 90A

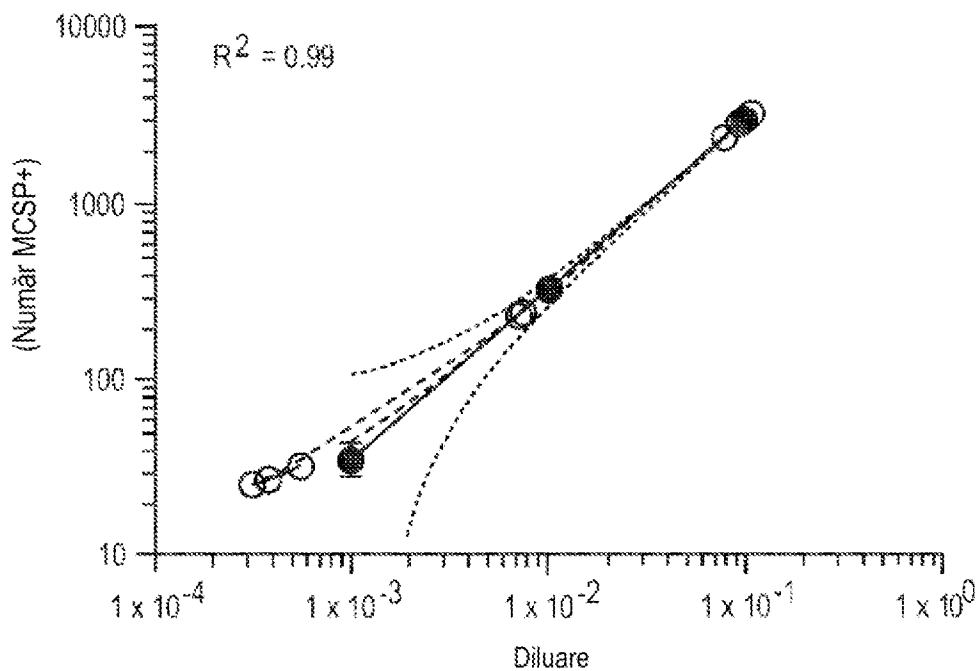


Figure 90B

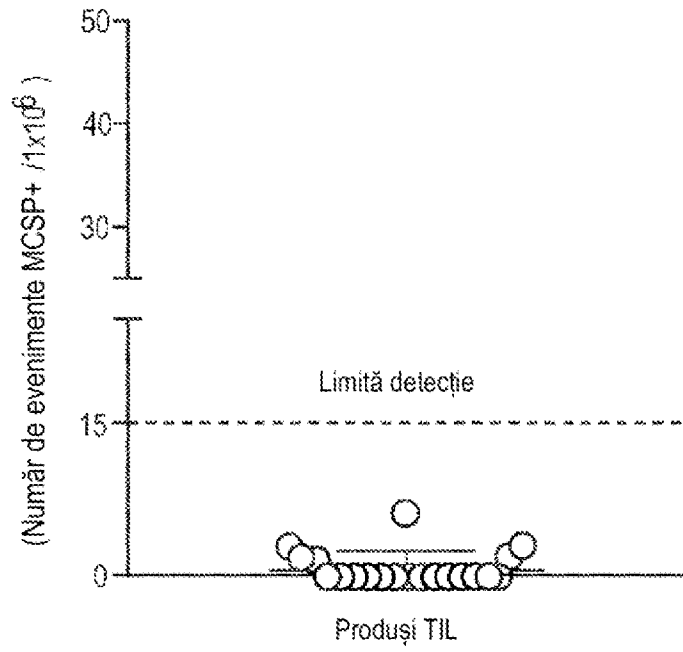
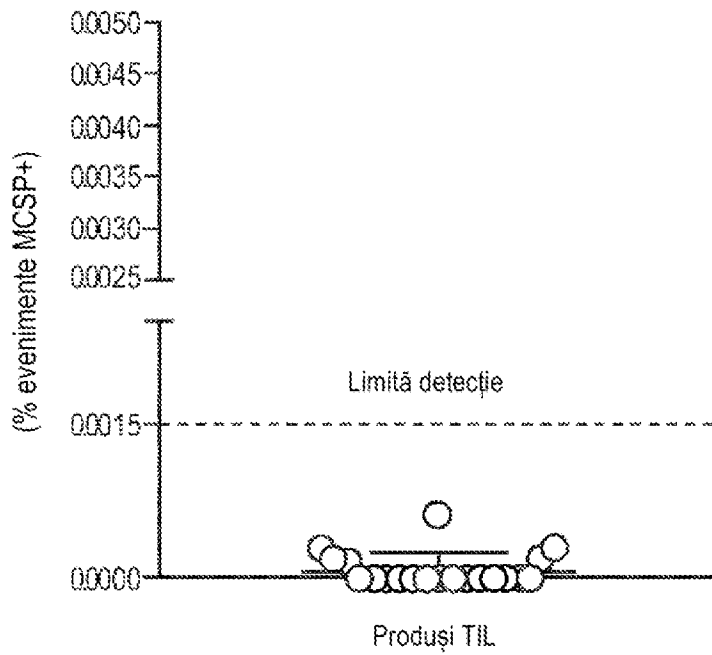


Figure 91A



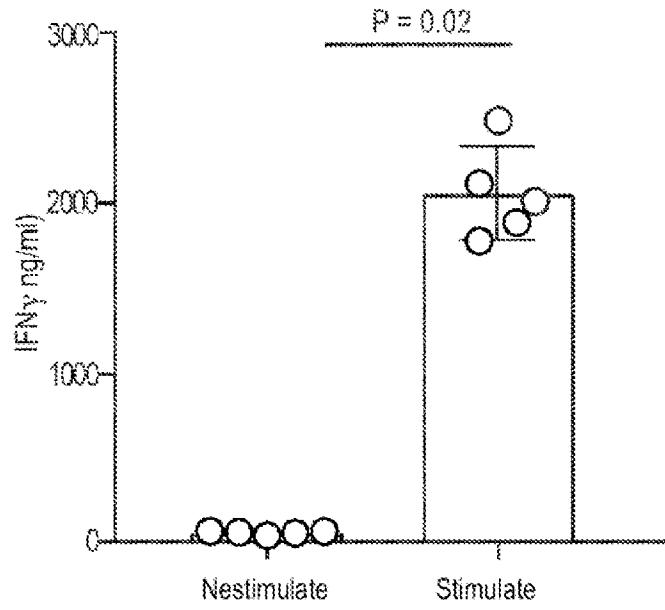


Figure 92

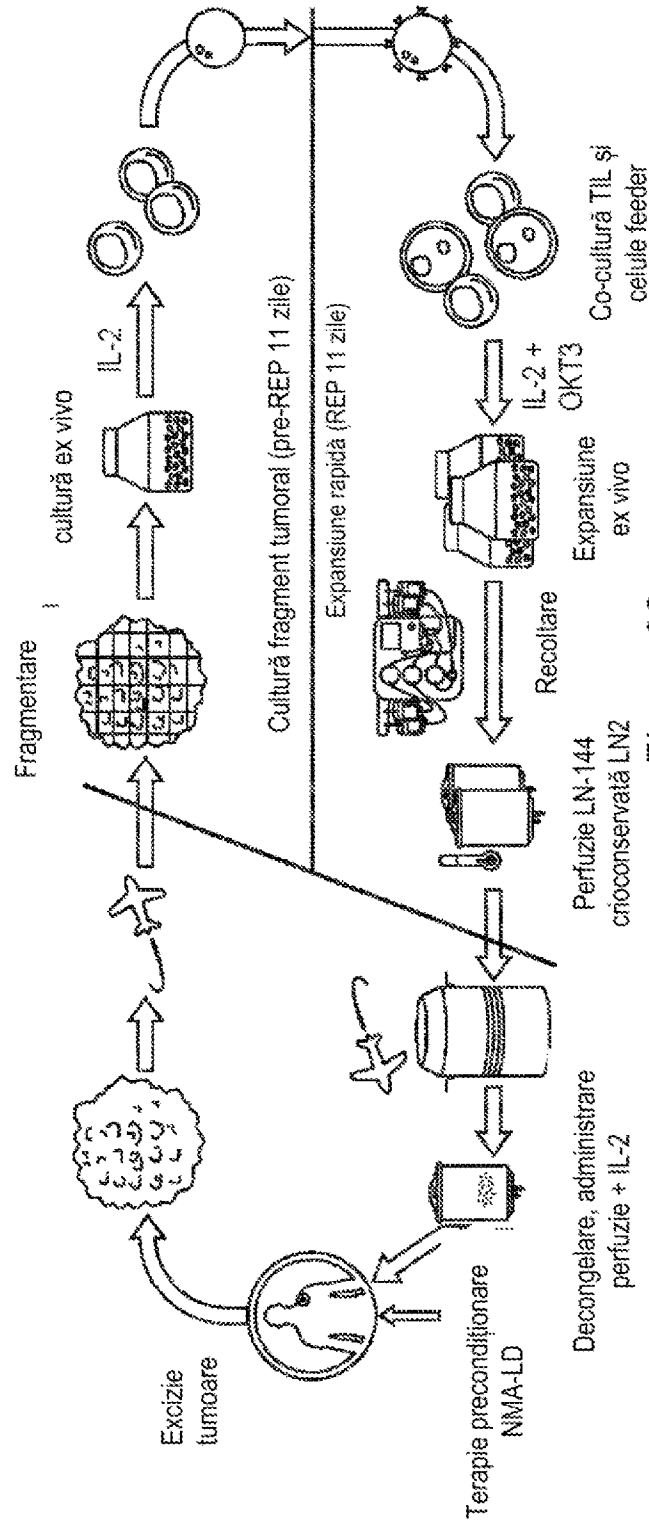


Figure 93

Figure 94

ETAPĂ PROCES	GEN 1	GEN 2	IMPACT
Cultură fragment	≤21 zile, bioreactoare multiple, intervenții multiple operator	≤11 zile, un singur bioreactor închis, fără intervenție	Scurtează cultura, reduce intervențiile
Selecție TIL	TIL amplificate cu IL-2 crioconservate, testate, selecție pe baza fenotipului, decongelare, odihnă, co-cultură	TIL în masă direct în co-cultură	Reduce etapele, elimină testarea, crește diversitatea clonală
Recoltare/spălare	Reducere manuală a volumului și recoltare. Spălare manuală și concentrare	Reducere închisă semi-automată a volumului și recoltare. Spălare automată și concentrare	Reduce intervențiile de operator, reduce timpul de procesare, menține sistemul funcțional închis
Compoziție	Produs hipotermic proaspăt (2-8°C)	Produs crioconservat (≤ -150°C)	Permite teste globale prin flexibilitate crescută a transportului și a programării pacienților
Timp producție	38 zile	22 zile	Revenire la pacient, cameră cu atmosferă controlată, costuri scăzute

Figure 95A

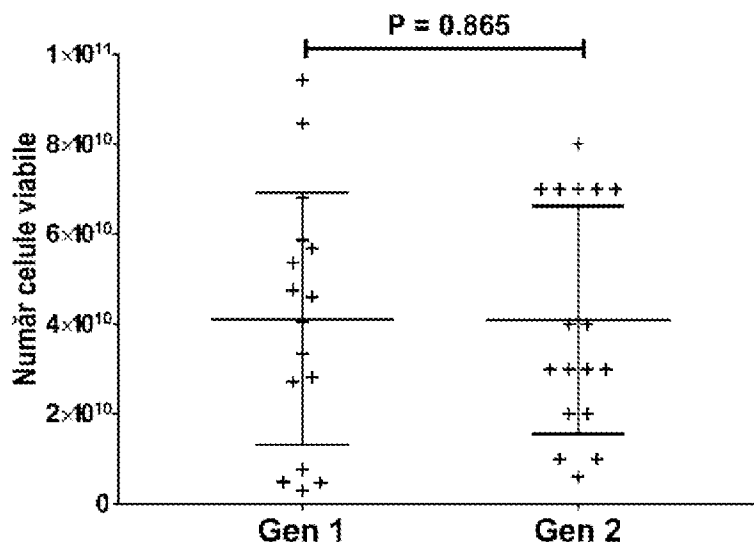


Figure 95B

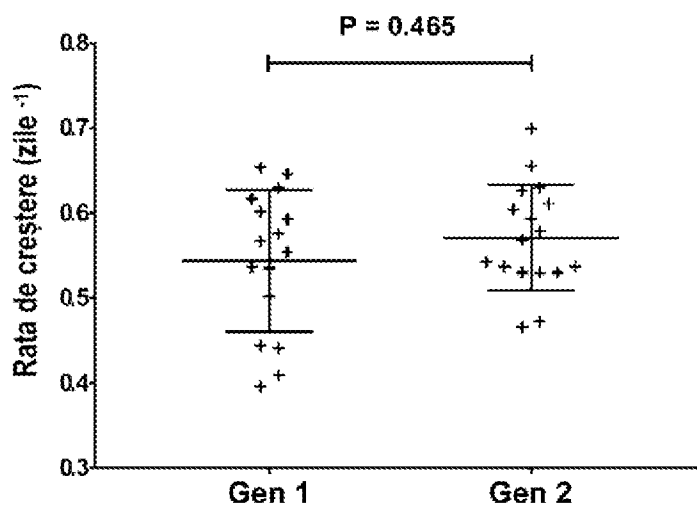


Figure 95C

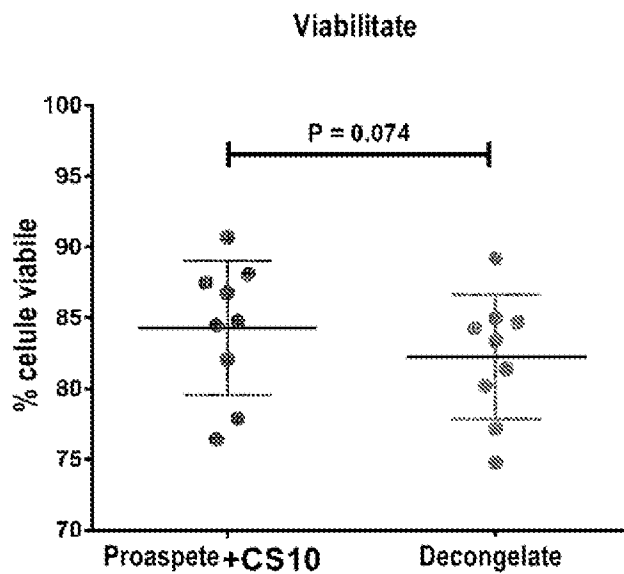


Figure 96A

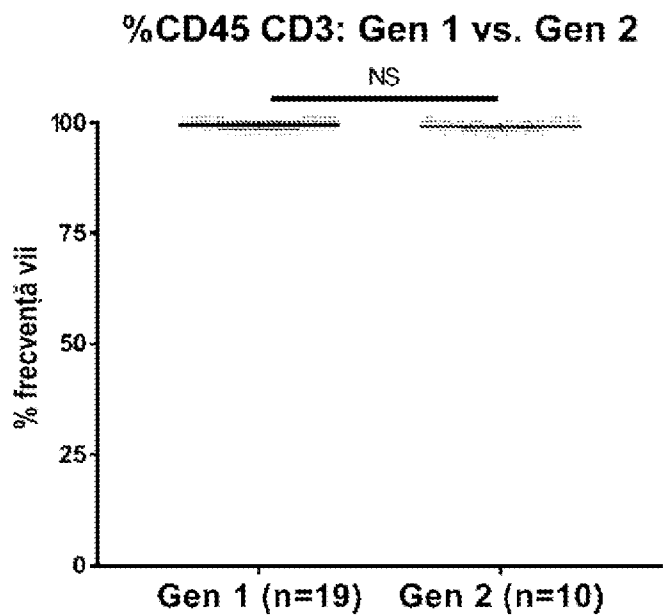


Figure 96B

Expresie CD27: Gen 1 vs. Gen2

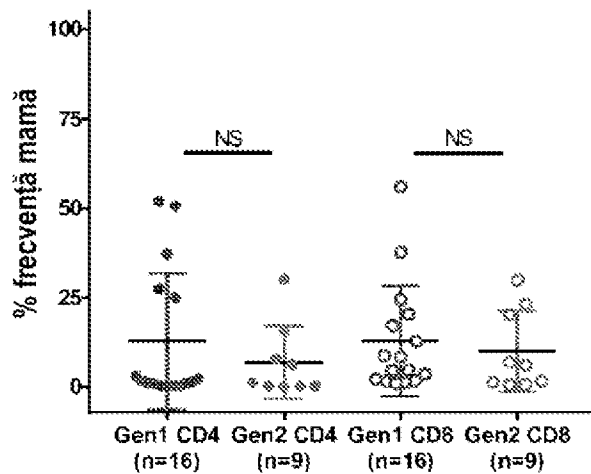


Figure 96C

Expresie CD28: Gen 1 vs. Gen2

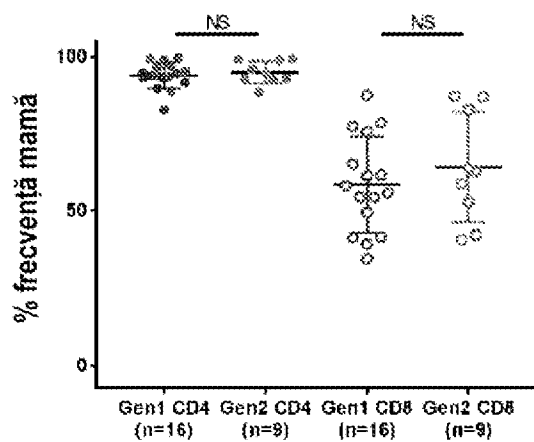


Figure 97

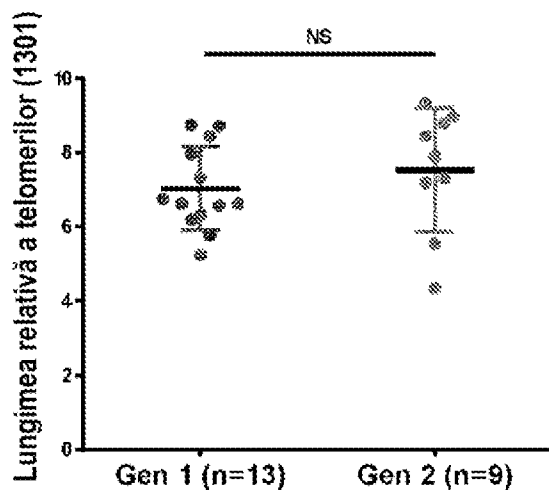


Figure 98

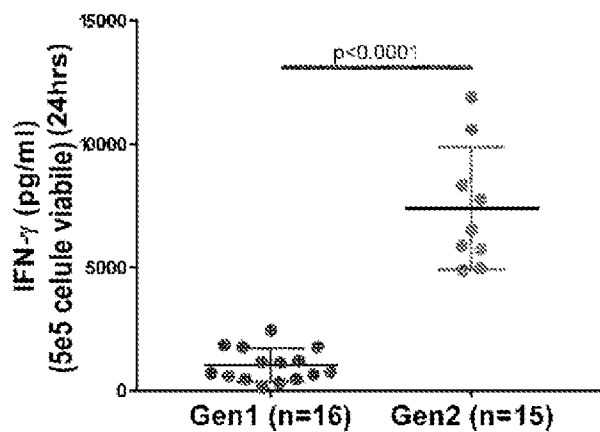


Figure 99A

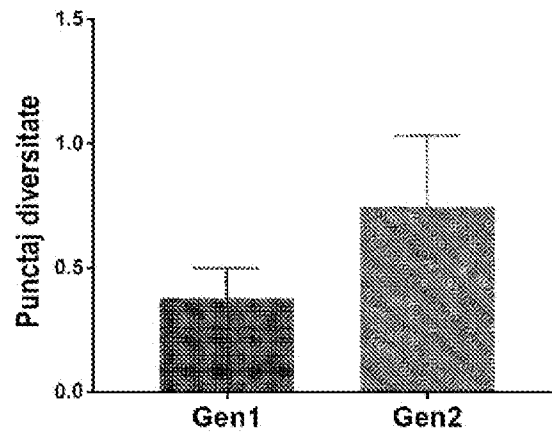


Figure 99B

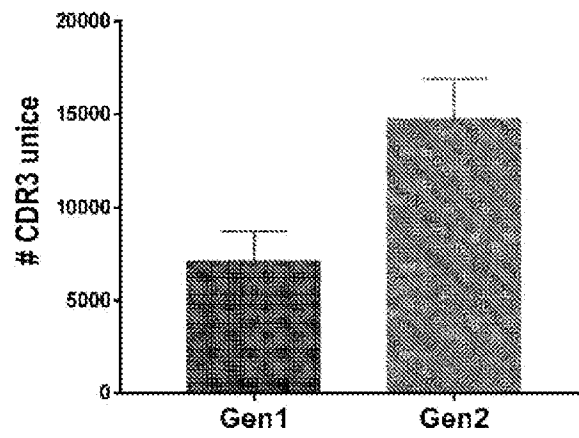


Figure 100

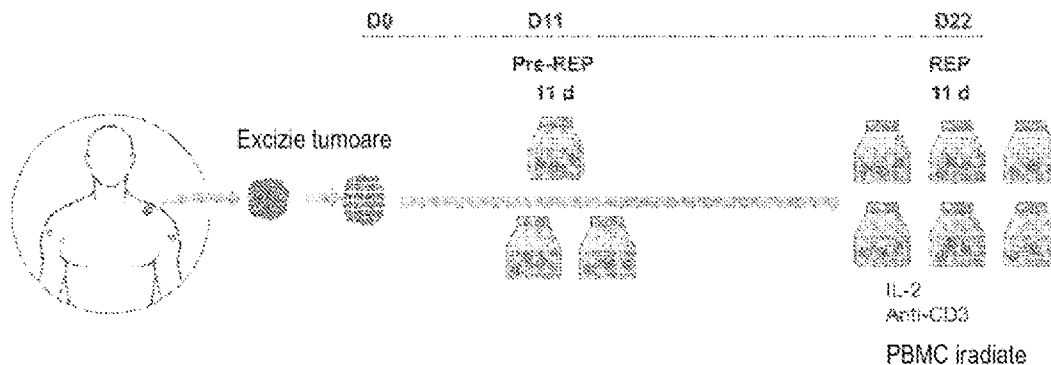


Figure 101

Histologie Tumoare	Nr. studii care demonstrează >20% creștere folosind IL-2/IL-15/IL-21 (comparativ cu IL-2)
Melanom	1/5 (20%)
Pulmonar	3/8 (38%)
Colorectal	7/11 (63%)
Col uterin	1/1 (100%)
Pancreatic	2/2 (100%)
Glioblastom	1/1 (100%)
Mamar triplu negativ	1/2 (50%)

Figure 102A

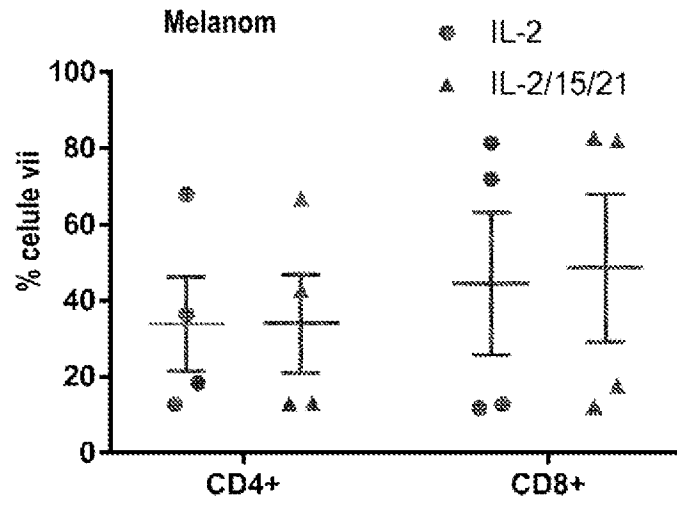


Figure 102B

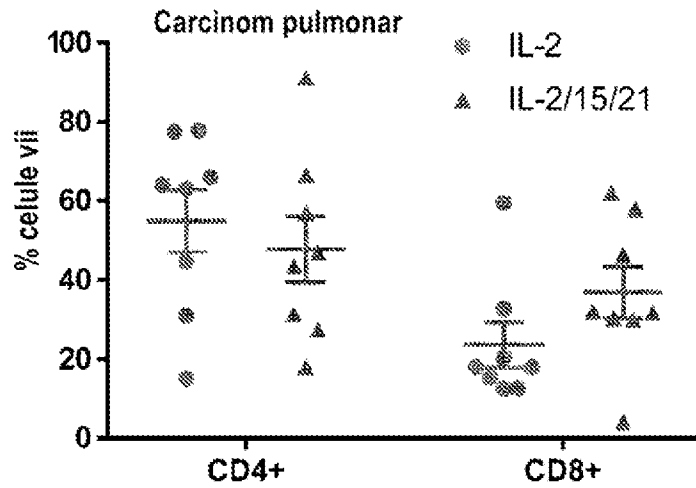


Figure 103A

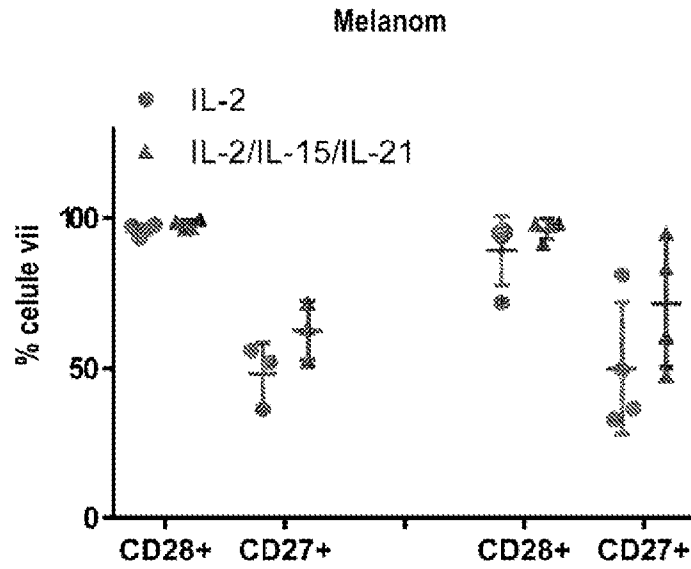


Figure 103B

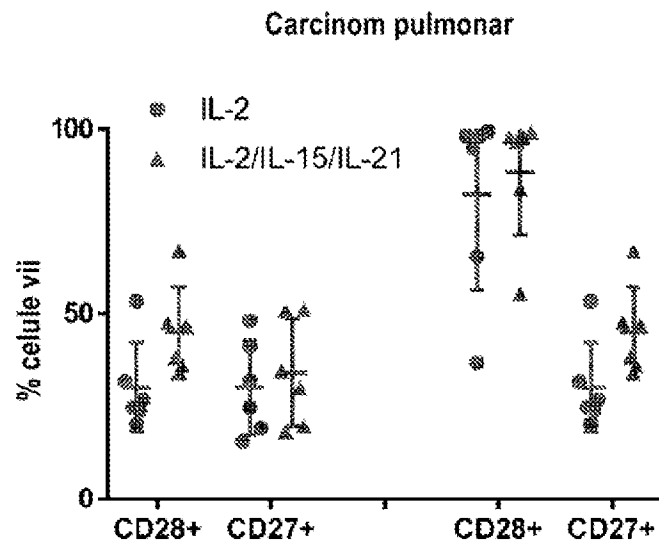


Figure 104A

Melanom

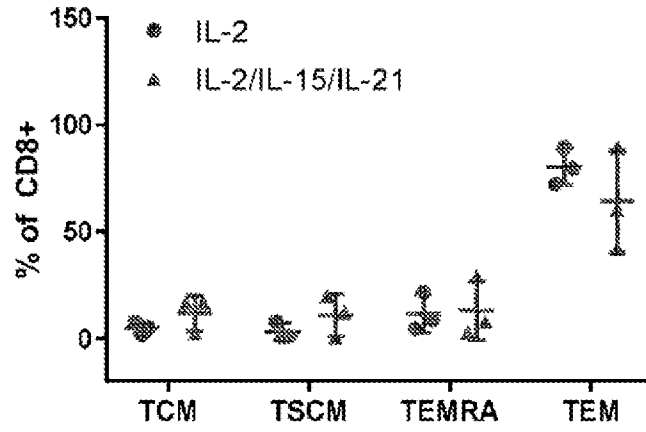


Figure 104B

Carcinom pulmonar

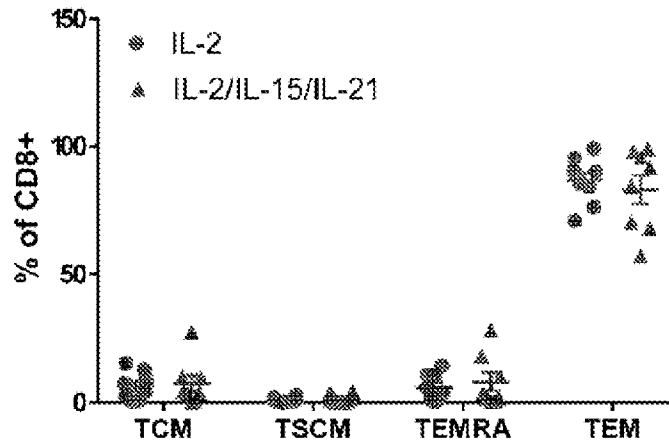


Figure 105A

Melanom

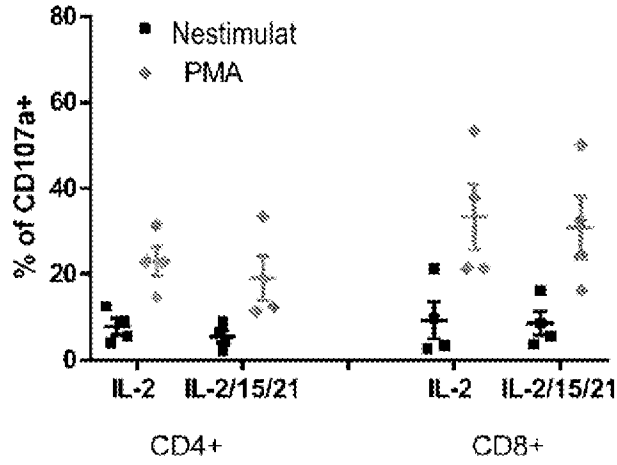


Figure 105B

Carcinom pulmonar

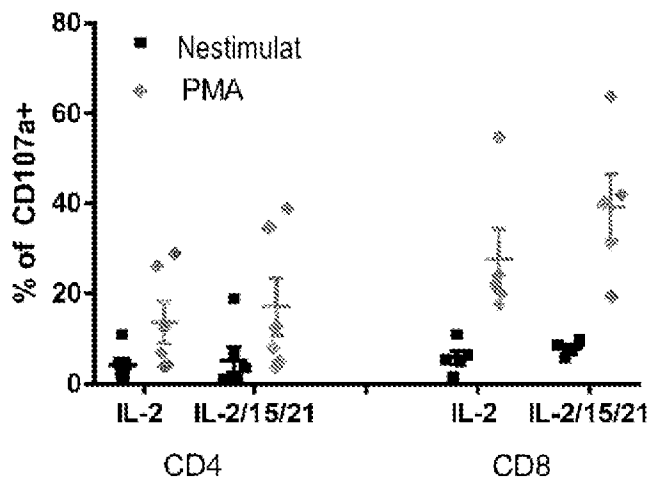


Figure 105C

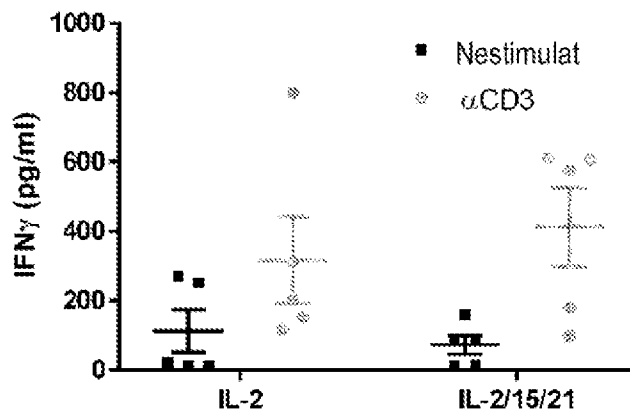
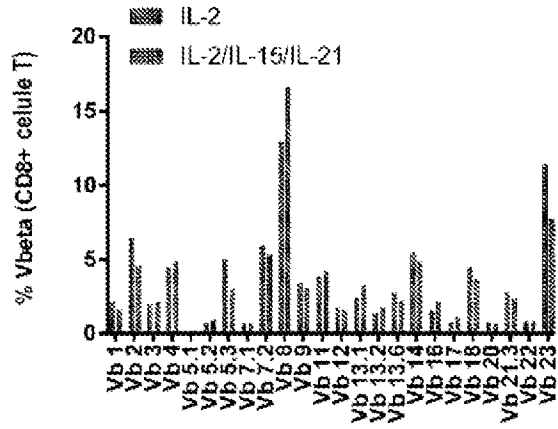
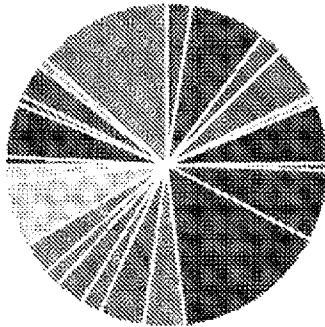


Figure 106A

Melanom



IL-2



IL-2/IL-15/IL-21

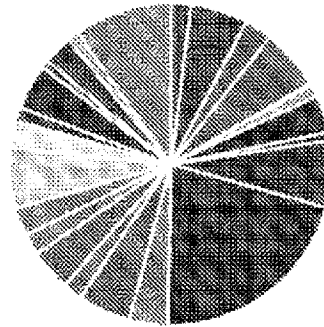
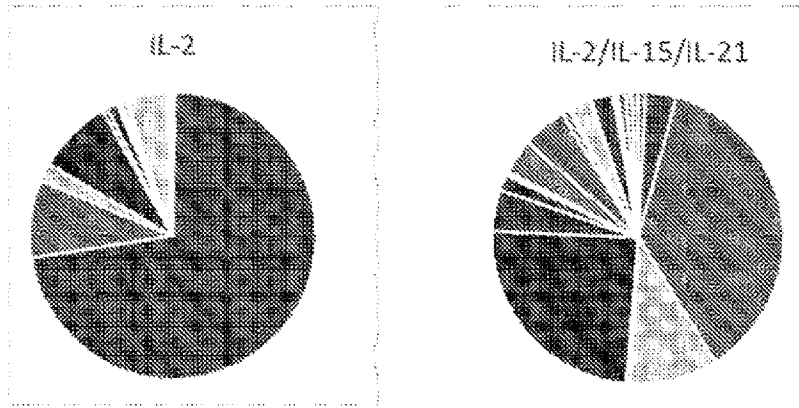
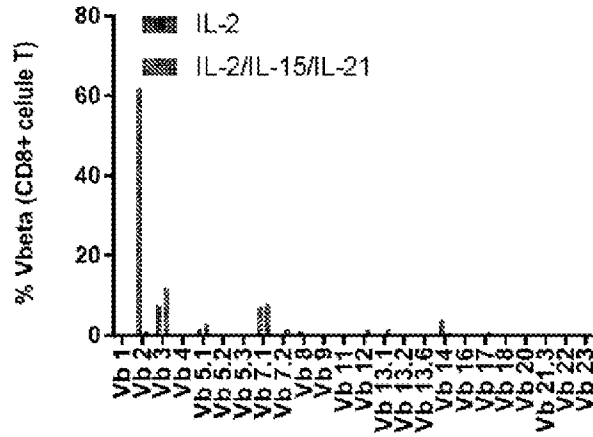


Figure 106B

Carcinom pulmonar



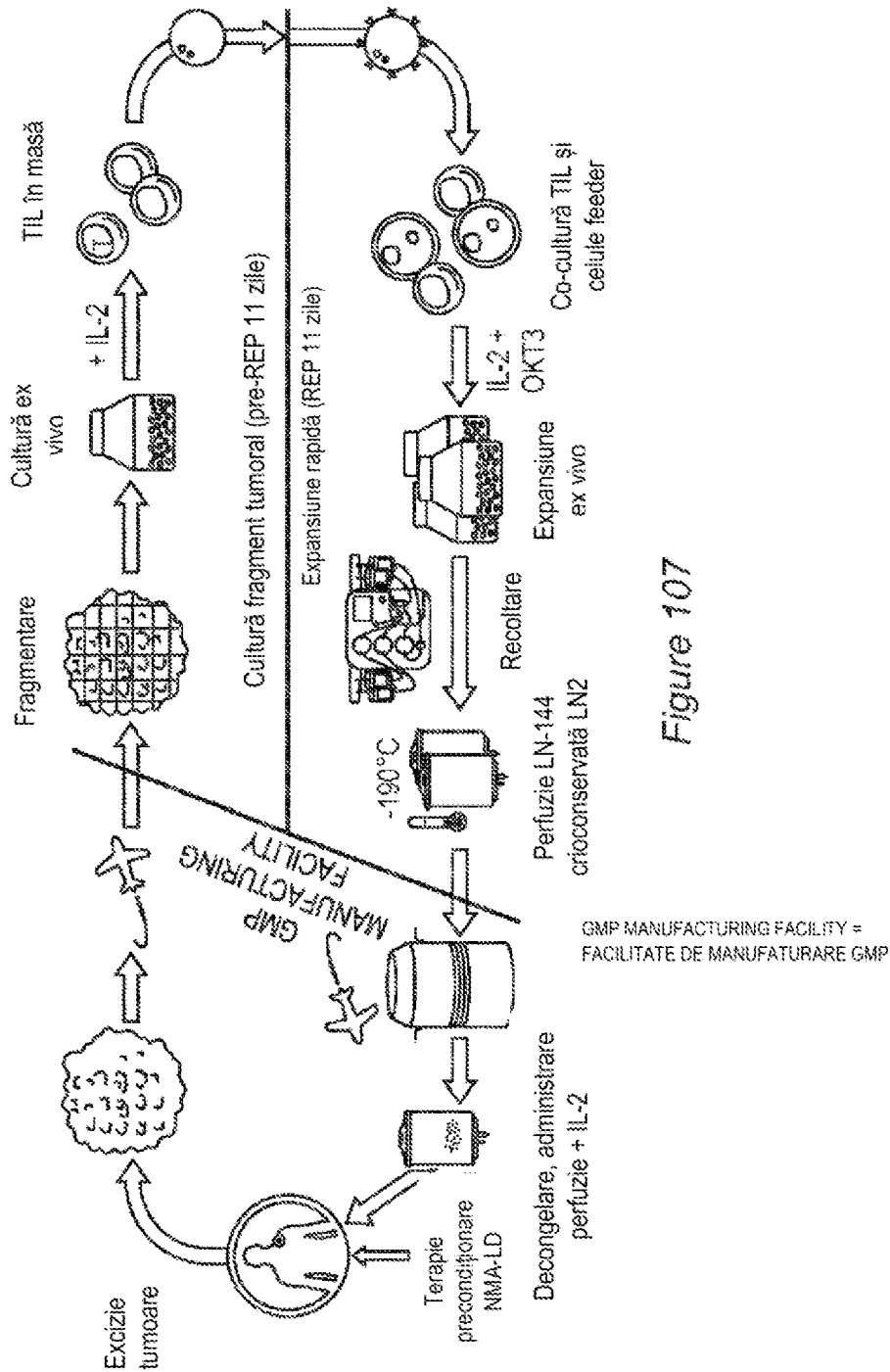
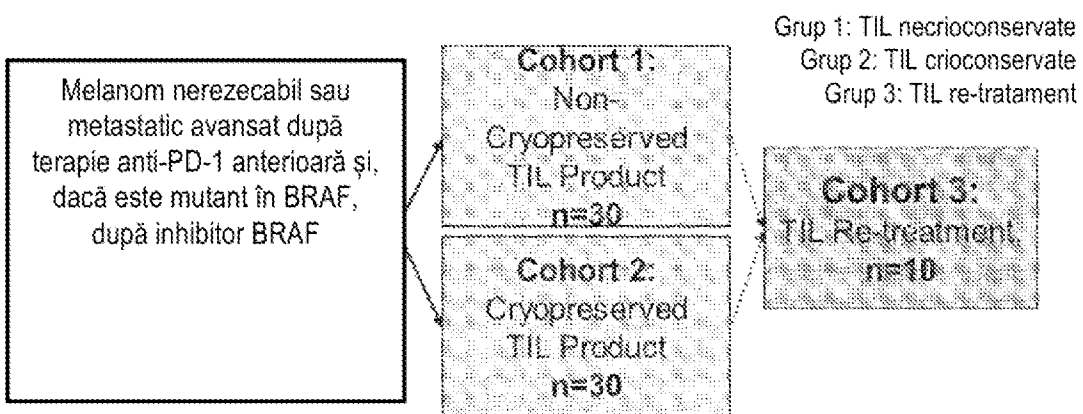


Figure 107

Figure 108



CARACTERISTICĂ		Grup 1 N = 16, (%)	Grup 2 N = 13, (%)
Sex	Gender, n (%)		
Masculin	Male	7 (44)	5 (39)
Feminin	Female	9 (56)	8 (62)
Vârsta	Age		
Medie	Median	55	54
	Min, Max	41, 72	35, 66
Terapii anterioare	Prior therapies, n (%)		
	Mean # prior systemic therapies	3	4
Medie terapii sistemice	Anti-CTLA-4	14 (88)	13 (100)
	Anti-PD-1	21 (100)	13 (100)
Diametru leziune	Target Lesion Sum of Diameter (mm)		
Medie	Mean (SD)	104 (68)	141 (102)
	Min, Max	15, 225	38, 342
		Historical Cohort 1* N = 16, (%)	Cohort 2 N = 13, (%)
Punctaj ECOG referință	CHARACTERISTIC Baseline ECOG score, n (%)		
	0	9 (56)	8 (62)
	1	7 (44)	5 (39)
Stare Braf Mutație	BRAF Status, n (%)		
	Mutated	9 (56)	6 (46)
Tip sălbatic	Wild Type	7 (44)	7 (54)
Referință 1-2 ori	Baseline LDH (U/L [SD])		
	1-2 times ULN	7 (44)	7 (54)
	Min, Max	1 (6)	2 (15)
Număr leziuni țintă și non-țintă (ref.) Medie	Number of Target & Non-Target Lesions (at Base Line)		
	>3	12(75)	10(77)
	Mean	5.6	5.5

Figure 109

		Grup 1			Grup 2		
TERMEN PREFERAT		Historical Cohort 1 (N = 16)			Cohort 2 (N = 13)		
		Any Grade n (%)	Grade 3/4 n (%)	Grade 5 n (%)	Any Grade n (%)	Grade 3/4 n (%)	Grade 5 n (%)
Nr. pacienți care raportează cel puțin un AE legat de tratament		14 (87.5)	14 (87.5)	0	12 (85.7)	11 (78.6)	0
Greață	Nausea	14 (87.5)	0	0	7 (53.8)	0	0
Nr. trombocite scăzut	Platelet count decreased	12 (75.0)	12 (75.0)	0	7 (53.8)	6 (46.2)	0
Anemie	Anaemia	11 (68.8)	8 (50.0)	0	8 (61.5)	7 (53.8)	0
Nr. neutrofile scăzute	Neutrophil count decreased	11 (68.8)	11 (68.8)	0	6 (46.2)	6 (46.2)	0
Neutropenie febrilă	Febrile neutropenia	10 (62.5)	10 (62.5)	0	7 (53.8)	6 (46.2)	0
Globule albe scăzute	White blood count decreased	10 (62.5)	10 (62.5)	0	6 (46.2)	6 (46.2)	0
Frisoare	Chills	9 (56.3)	0	0	6 (46.2)	1 (7.7)	0
Diaree	Diarrhoea	8 (50.0)	1 (6.3)	0	4 (30.8)	0	0
Oboseală	Fatigue	7 (43.8)	0	0	7 (53.8)	0	0
Vomă	Vomiting	7 (43.8)	0	0	2 (15.4)	0	0
Constipație	Constipation	6 (37.5)	0	0	3 (23.1)	0	0
Apetit scăzut	Decreased appetite	5 (31.3)	0	0	4 (30.8)	0	0
Migrană	Headache	5 (31.3)	0	0	3 (23.1)	0	0
Hipocalcemie	Hypocalcaemia	5 (31.3)	0	0	1 (7.7)	0	0
Hipopotasemie	Hypokalaemia	5 (31.3)	0	0	3 (23.1)	0	0
Hipofosfatemia	Hypophosphataemia	5 (31.3)	5 (31.3)	0	4 (23.1)	1 (7.7)	0
Hipotensiunea	Hypotension	5 (31.3)	2 (12.5)	0	3 (23.1)	3 (7.7)	0
Limfocite scăzute	Lymphocyte count decreased	5 (31.3)	5 (31.3)	0	3 (23.1)	3 (23.1)	0
Congestie nazală	Nasal Congestion	5 (31.3)	0	0	0	0	0
Pirexie	Pyrexia	5 (31.3)	0	0	9 (69.2)	1 (7.7)	0
Tuse	Cough	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0
Edem periferic	Oedema peripheral	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0
Prurit	Pruritus	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0

Obs.: evenimentele adverse sunt codate de MedDRA versiunea 18.1.

Pacienții cu evenimente multiple pentru un termen preferat dat se numără doar o dată folosind nivelul maxim din fiecare termen preferat.

Evenimentele sunt sortate în funcție de scăderea frecvenței termenului preferat conform SOC per fiecare nivel.

Evenimentele adverse asociate cu tratamentul se referă la AE care apar la sau după prima doză a pretratamentului chimioterapeutic (fludarabină și ciclofosamidă) până la ultima doză de IL2 + 30 zile.

Figure 110

Figure 111

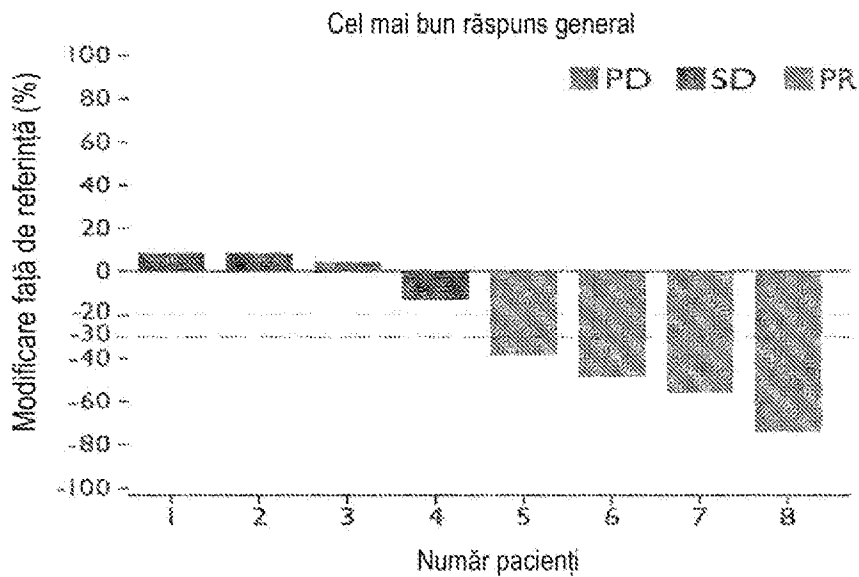
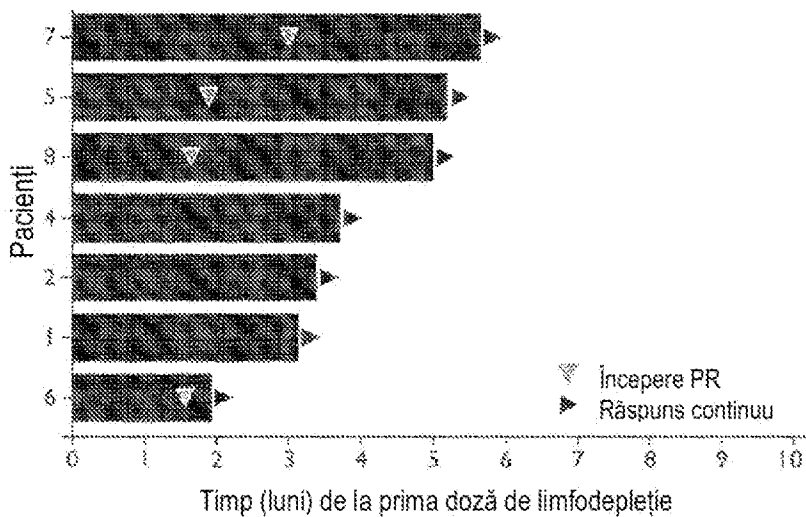


Figure 112



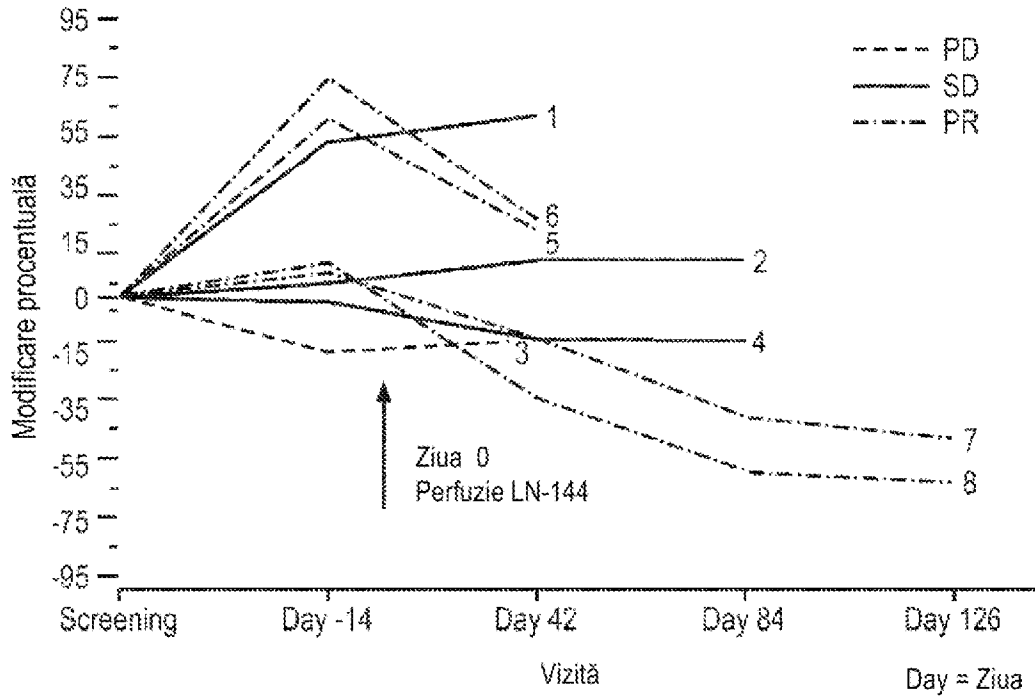


Figure 113

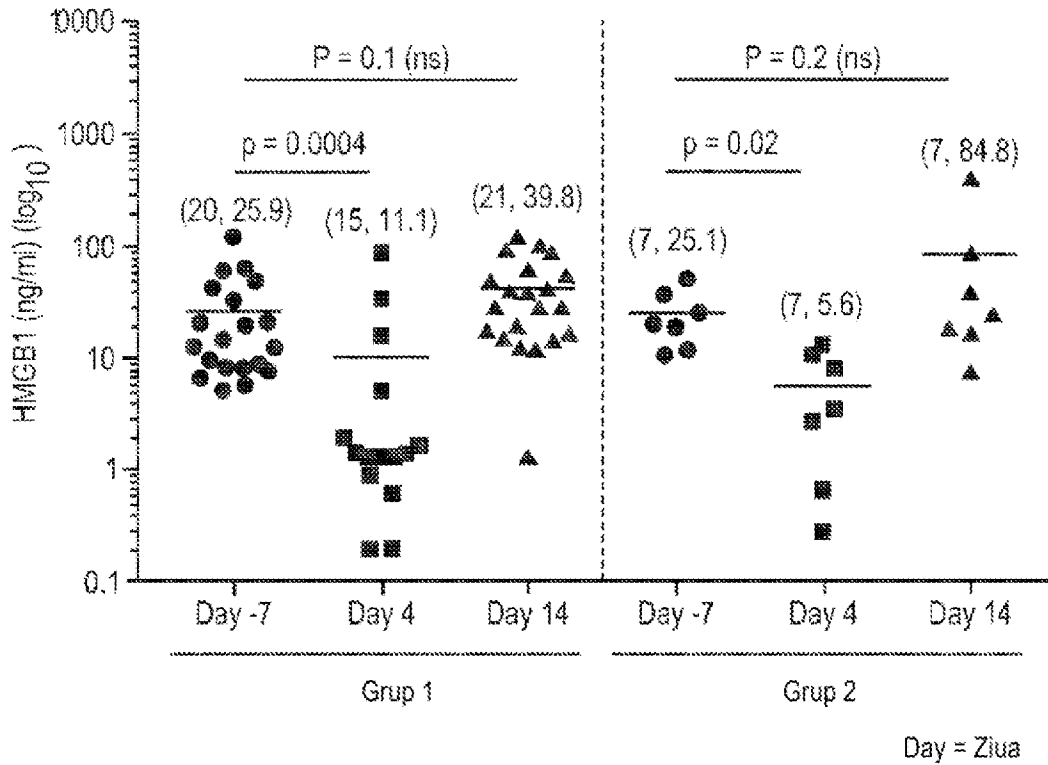


Figure 114

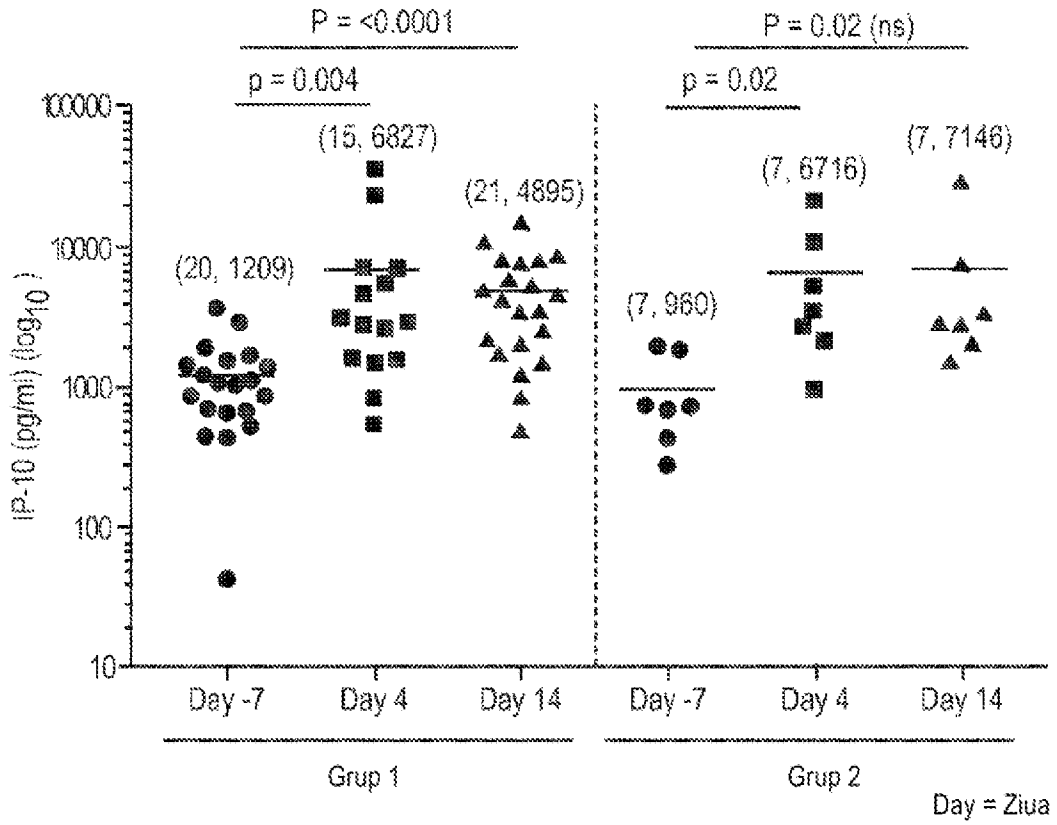


Figure 115

		Grup 2
CARACTERISTICĂ		Cohort 2 N = 17, (%)
Sex	Gender, n (%)	
Masculin	Male	8 (47)
Feminin	Female	9 (53)
Vârsta	Age	
Medie	Median	54
	Min, Max	35, 66
Terapii anterioare	Prior therapies, n (%)	
Medie terapii sistemice	Mean # prior systemic therapies	3.6
	Anti-CTLA-4	15 (88)
	Anti-PD-1	16 (94)
Diametru leziune	Target Lesion Sum of Diameter (mm)	
Medie	Mean (SD)	140 (93)
	Min, Max	38, 342
		Cohort 2 N = 17, (%)
Punctaj ECOG	CHARACTERISTIC Baseline ECOG, n (%)	
referință	0	11 (65)
	1	6 (35)
Stare Braf Mutație	BRAF Status, n (%)	
Tip sălbatic	Mutated	5 (29)
Necunoscut	Wild Type	9 (53)
	Unknown	3 (18)
Referință 1-2 ori	Baseline LDH (U/L [SD])	
	1-2 times ULN	8 (47)
	> 2 times ULN	2 (12)
Număr leziuni țintă și non-țintă (ref.)	Number of Target & Non-Target Lesions (at Base Line)	
Medie	> 3	12 (71)
	Mean	5.9

Grupul 2 are:

3,6 terapii medii anterioare.

Încărcătură tumorală mare la referință reflectată de suma de 140 mm a diametrelor pentru leziuni țintă

Figure 116

Grup 2

TERMEN PREFERAT		Cohort 2 (N = 17)		
		Any Grade n (%)	Grade 3/4 n (%)	Grade 5 n (%)
Nr. pacienți care raportează cel puțin un AE legat de tratament		16 (94.1)	16 (94.1)	0
Pirexie	Pyrexia	13 (76.5)	1 (5.9)	0
Anemie	Anaemia	11 (64.7)	10 (58.8)	0
Nr. neutrofile scăzut	Neutrophil count decreased	10 (58.8)	10 (58.8)	0
Nr. trombocite scăzut	Platelet count decreased	10 (58.8)	8 (47.1)	0
Neutropenie	Febrile neutropenia	10 (58.8)	8 (47.1)	0
febriă	Fatigue	10 (58.8)	0	0
Oboseală	Chills	9 (52.9)	1 (5.9)	0
Frisoane	Nausea	9 (52.9)	0	0
Greață	White blood cell count decreased	8 (47.1)	8 (47.1)	0
Globule albe scăzute	Lymphocyte count decreased	6 (35.3)	6 (35.3)	0
Limfocite scăzute	Diarrhea	6 (35.3)	0	0
Diaree	Decreased appetite	6 (35.3)	0	0
Apetit scăzut				

Obs.: Pacienți cu evenimente multiple pentru un termen preferat dai se numără doar o dată folosind nivelul maxim din fiecare termen preferat. Evenimentele adverse asociate cu tratamentul se referă la AE care apar la sau după prima doză a pretratamentului chimioterapeutic (fludarabină și ciclofosfamidă) până la ultima doză de IL2 + 30 zile.

Figure 117

Figure 118

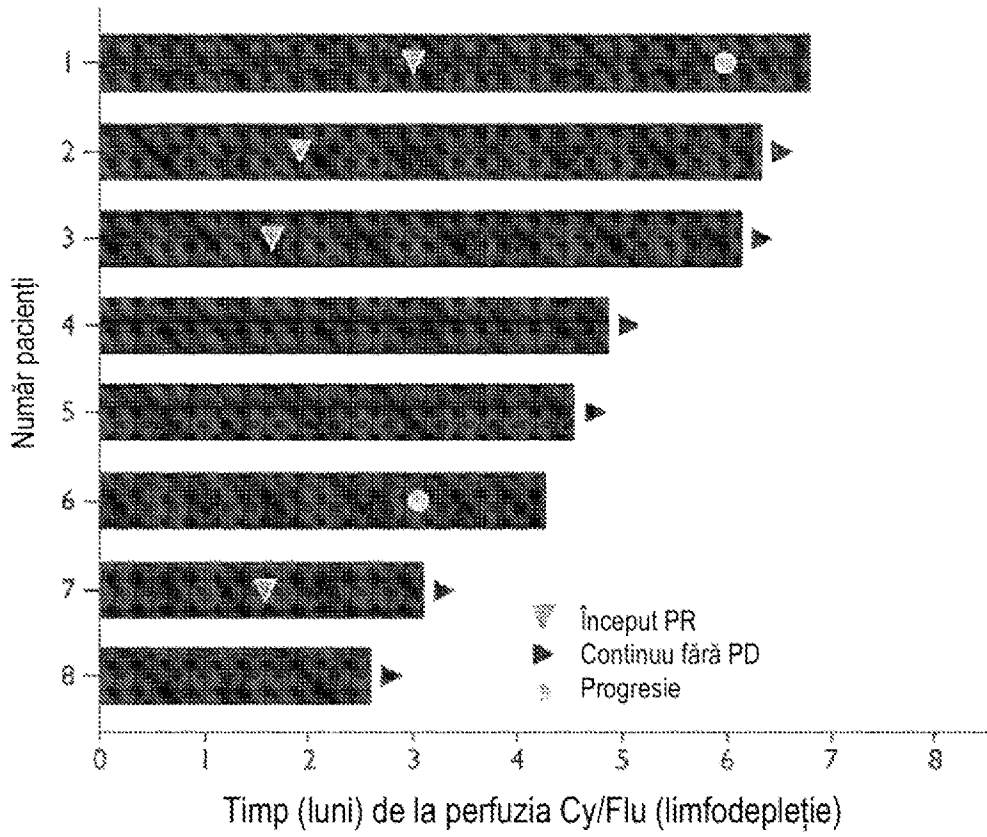


Figure 119

Cel mai bun răspuns general

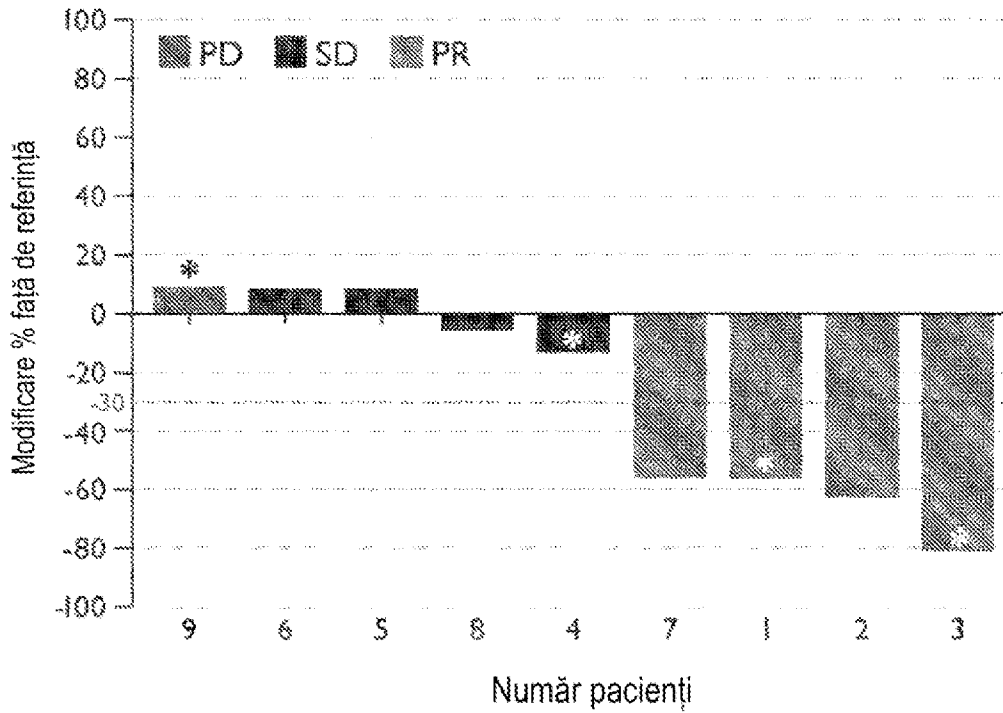


Figure 120

RĂSPUNS	PACIENȚI, N = 10 n(%)
Rată răspuns obiectiv	4 (40%)
Rată control boală	8 (80%)
Răspuns parțial	4 (40%)
Boală stabilă	4 (40%)
Boală progresivă	1 (10%)
Neevaluabil*	1 (10%)

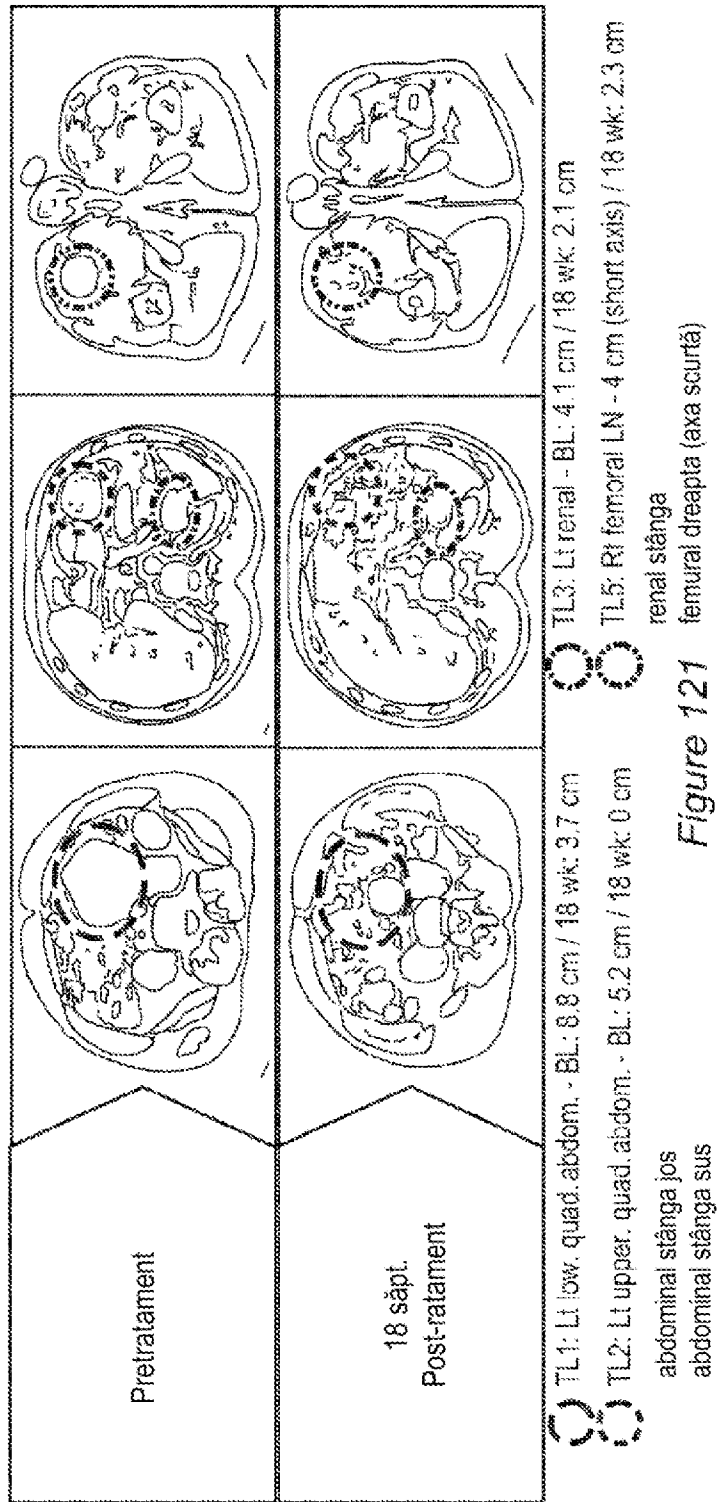
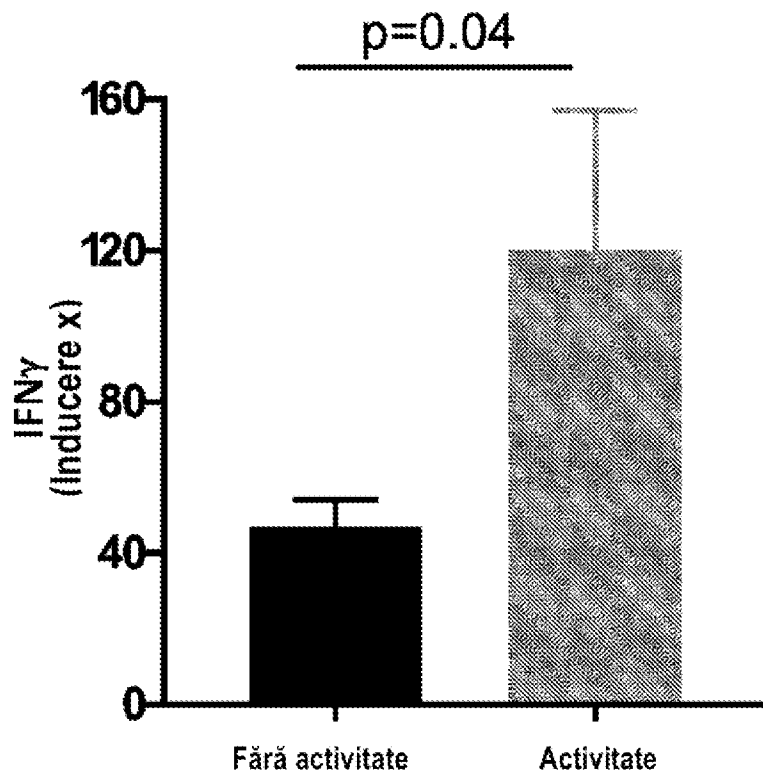


Figure 121

Figure 122



IP-10 (pg/ml) (log₁₀)

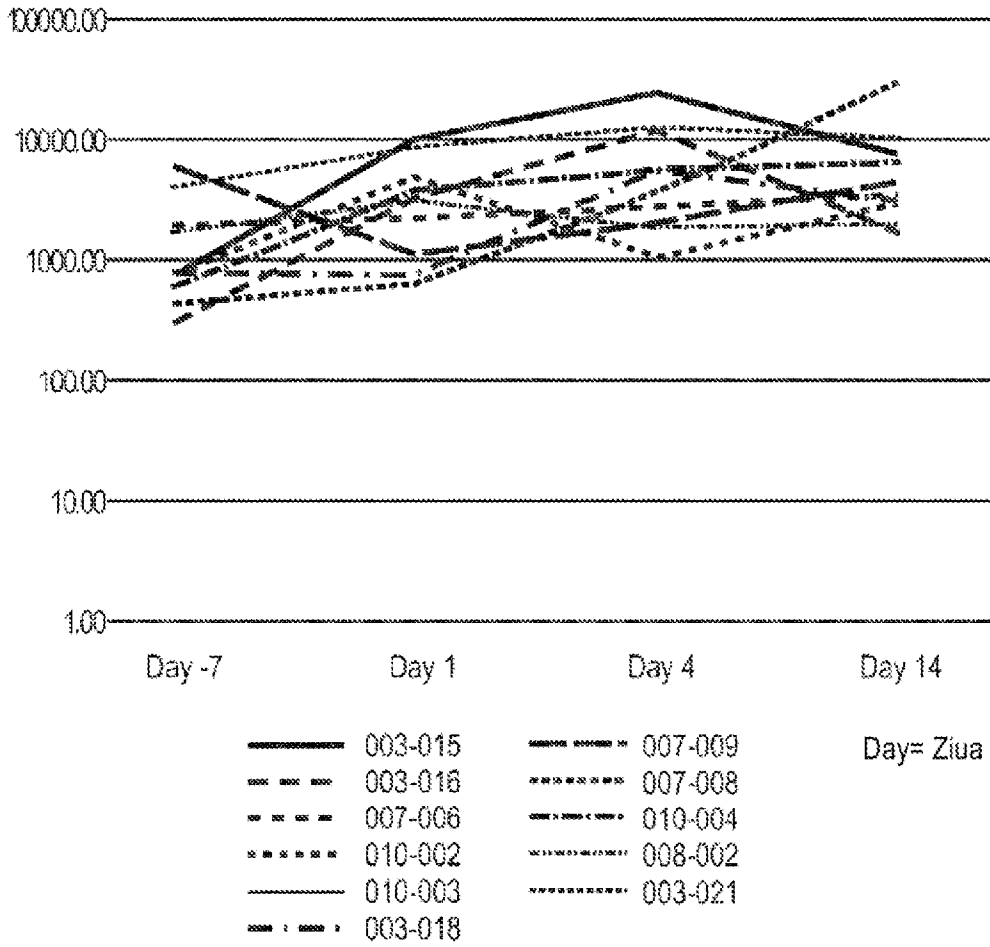


Figure 123

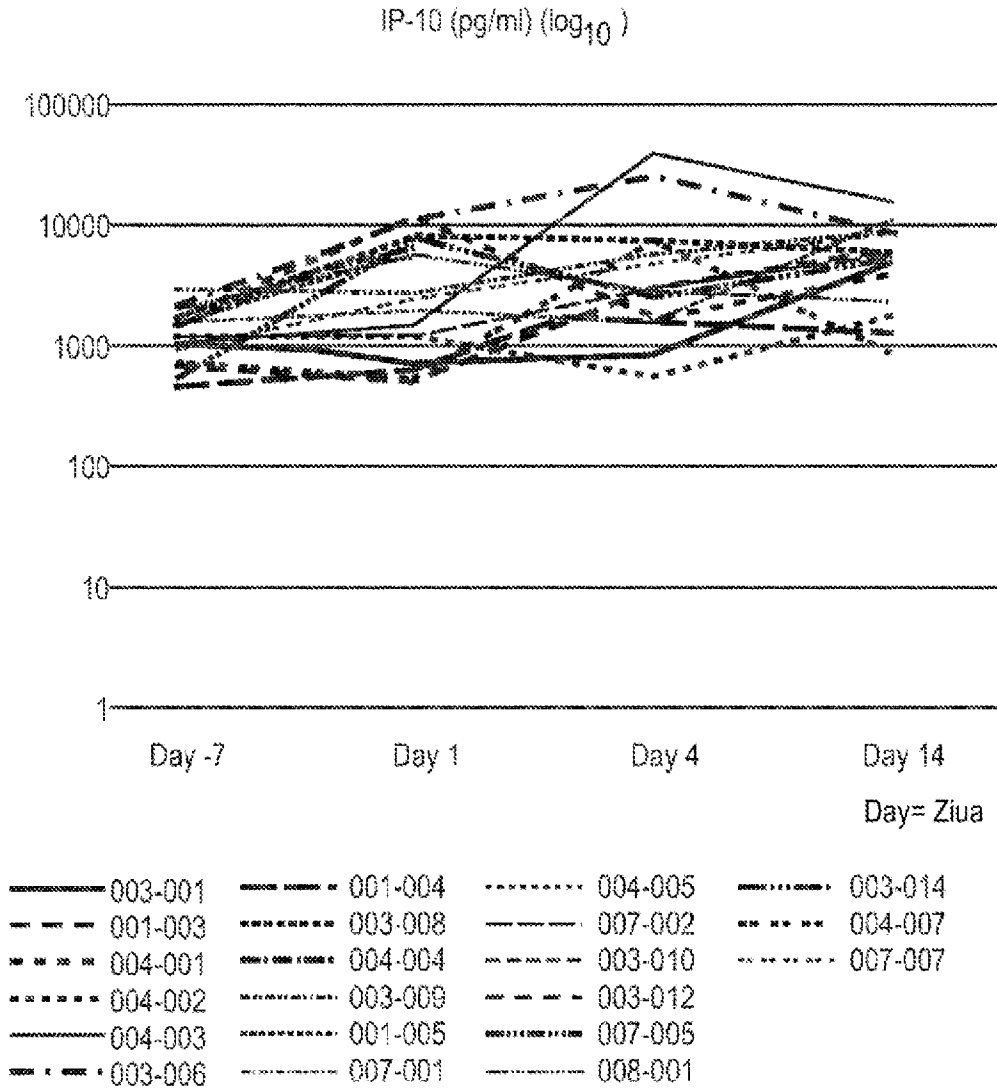


Figure 124

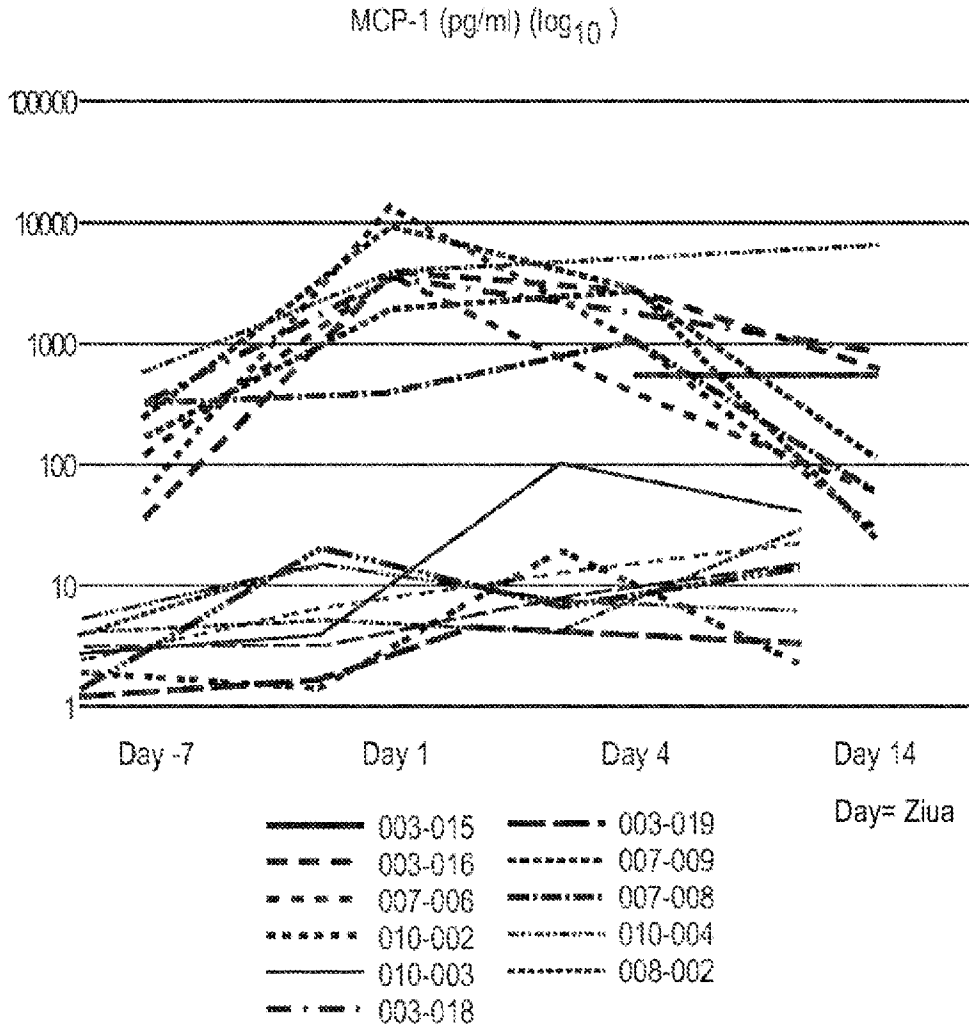


Figure 125

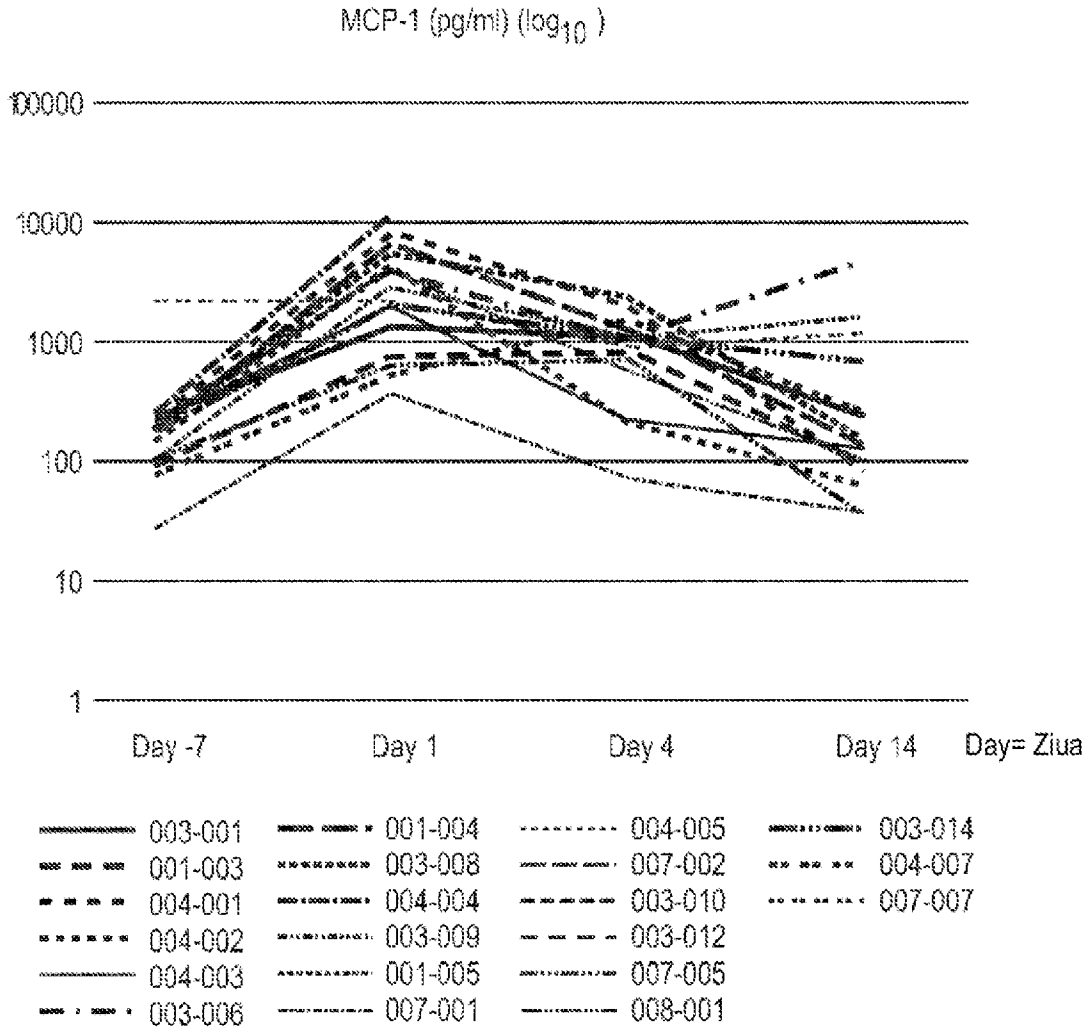


Figure 126

Cervical Carcinoma (C-145-04)									
Pt No	INFUSION	# CELLS INFUSED	RESPONSE DAY 42	RESPONSE DAY 84	RESPONSE DAY 126	RESPONSE AT 6 MONTHS	RESPONSE AT 9 MONTHS	RESPONSE AT 6 MONTHS	BOR
1	9-Aug-17	32.6 bil	PR	PR	-	-	-	-	-
2	19-Sep-17	41.4 bil	SD (needs confirmation)			-	-	-	-
HNSCC (C-145-03)									
Pt No	INFUSION	# CELLS INFUSED	RESPONSE DAY 28	RESPONSE DAY 56	RESPONSE DAY 84	RESPONSE AT 4 MONTHS	RESPONSE AT 6 MONTHS	RESPONSE AT 6 MONTHS	BOR
1	31-May-17	21 bil	SD	PD	Discon.	-	-	-	SD
2	20-Jun-17	21 bil	PR	SD	SD	Passed away.	-	-	SD
3	1-Aug-17	30 bil	PR	PR	PR	PD	-	-	PR
4	14-Sep-17	65 bil	PR	PR	-	-	-	-	PR
5	03-Nov-17	10 bil	-	-	-	-	-	-	-
6	07-Nov-17	37 bil	-	-	-	-	-	-	-
7	08-Nov-17	21.5 bil	-	-	-	-	-	-	-

Median Prior therapies for HNSCC: 4, all have had poor anti-PD-1. The data is live and subject to change.

Figure 127

Carcinon de col uterin
Administrate/Celule administrate/
Răspuns ziua

Răspuns ziua/luna

Terapii anterioare medii pentru HNSCC: 4, toate cu rezultate anti-PD-1 slabe. Datele sunt actualizabile și pot fi modificate.